

Humboldt Universität zu Berlin

Dissertation

# **Identifizierung, molekulare Eigenschaften und Regulation einer renalen 20- Hydroxyeicosatetraensäure-Synthase**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät 1

Cosima Schmidt

Dekan: Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann

2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

3. PD Dr. Dominik N. Müller

eingereicht: 06.08.2008

Datum der Promotion: 11.12.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Die drei Wege der Arachidonsäure Kaskade	1
1.2 Struktur und Funktion von Cytochrom P450-Enzymen und ihre Rolle im Arachidonsäure Metabolismus	3
1.2.1 Spektrale und katalytische Eigenschaften von Cytochrom P450-Enzymen	3
1.2.2 Cytochrom P450 Systeme und ihr Reaktionszyklus im endoplasmatischen Retikulum	3
1.2.3 Reaktionstypen und Primärprodukte des Cytochrom P450-abhängigen Arachidonsäure Metabolismus	5
1.2.4 Arachidonsäure metabolisierende Cytochrom P450-Isoformen und ihre orthologen Gene bei Nagern und Menschen	6
1.2.5 Cytochrome P450 4A sind AA-Hydroxylasen	7
1.3 Cytochrom P450-abhängige Eicosanoidbildung und – wirkung im physiologischen und pathophysiologischen Kontext	9
1.3.1 Arachidonsäurefreisetzung und CYP-abhängig gebildete Metabolite als sekundäre Botenstoffe	9
1.3.2 CYP-abhängig gebildete Metabolite im zellulären und physiologischen Kontext	10
1.3.3 CYP-abhängig gebildete Metabolite im pathophysiologischen Kontext am Beispiel von Ischämie/Reperfusion	10
1.4 Modulation der Cytochrom P450-abhängigen Bildung von Eicosanoiden durch systemische und gewebespezifische Faktoren	11
1.5 Biologische Wirkung von 20-HETE und EETs	13
1.5.1 Regulation des Gefäßtonus	13
1.5.2 Regulation der Tubulusfunktionen in der Niere	15
1.5.3 Regulation der Herzfunktion	17
1.6 Sekundärproduktbildung und „metabolisches Schicksal“ Cytochrom P450-abhängiger Eicosanoide	17
1.7 Struktur und kardiovaskuläre Funktion der löslichen Epoxidhydrolase	18
1.7.1 Enzymatische Eigenschaften	18
1.7.2 Physiologische Rolle der löslichen Epoxidhydrolase	19
1.8 Zielsetzung	21
	I

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Gentechnische Methoden</b>	<b>22</b>
2.1.1	RNA-Isolierung	22
2.1.2	TaqMan-RT-PCR	23
2.1.3	Cyp4a cDNA Generierung mittels RT-PCR	23
2.1.4	Klonierung der Cyp4a-Isoformen	24
2.1.5	Klonierung von Cyp4a12a in den Vektor pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP	26
2.1.6	Genotypisierung von Cre/loxP Cyp4a12a Mäusen	27
<b>2.2</b>	<b>Mikro- und zellbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	28
2.2.2	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen	28
2.2.3	Herstellung rekombinanter Cyp4a/Baculoviren	28
2.2.4	Bestimmung des Titters der rekombinanten Cyp4a/Baculoviren	29
2.2.5	Heterologe Expression der Cyp4a-Isoformen in <i>Sf9</i> -Zellen	29
<b>2.3</b>	<b>Präparative Methoden</b>	<b>30</b>
2.3.1	Präparation von Mikrosomen und zytosolischen Fraktionen	30
2.3.2	Präparationen für Proteinanalytik mit Westernblot	31
2.3.3	Organpräparation für Immunfluoreszenz-Untersuchungen	32
2.3.4	Organpräparationen für elektronenmikroskopische Untersuchungen	32
<b>2.4</b>	<b>Spektralphotometrische Untersuchungen</b>	<b>33</b>
2.4.1	Bestimmung der Cytochrom P450-Konzentration	33
2.4.2	Bestimmung der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität	33
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
<b>2.5</b>	<b>Proteinanalytik</b>	<b>34</b>
2.5.1	Herstellung eines Cyp4a12 Peptid-spezifischen Antikörpers	34
2.5.2	SDS-Gelelektrophorese	35
2.5.3	Nachweis im Westernblot	35
2.5.4	Immunreaktion an Organschnitten	36
<b>2.6</b>	<b>Chemische Synthesen und enzymatische Aktivitätsassays</b>	<b>37</b>
2.6.1	Epoxidsynthesen	37
2.6.2	Assays zur Bestimmung von Fettsäure Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität	38
2.6.3	Assays zur Bestimmung der Hydrolaseaktivität	40
<b>2.7</b>	<b>Chromatographische Methoden</b>	<b>42</b>
2.7.1	Revers Phasen HPLC	42
2.7.2	Normal Phasen HPLC	44
2.7.3	Chiral Phasen HPLC	44

2.7.4	Gas-Chromatographie / Massen-Spektrometrie	45
<b>2.8</b>	<b>Tierversuche</b>	<b>46</b>
2.8.1	Verwendete Mausestämme für Analysen der Expression von Cyp4a12a, der 20-HETE Bildung und der sEH Aktivität	46
2.8.2	sEH knockout Mäuse	47
2.8.3	Cre/loxP Mäuse	47
2.8.4	Verwendete Rattenstämme	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung, heterologe Expression und enzymatische Eigenschaften der Cyp4a-Isoformen der Maus</b>	<b>49</b>
3.1.1	Gewinnung der cDNA und Sequenzidentität der Cyp4a-Isoformen der Maus	50
3.1.1.1	Sequenzidentität von Cyp4a10	51
3.1.1.2	Sequenzidentität von Cyp4a12a	51
3.1.1.3	Sequenzidentität von Cyp4a12b	51
3.1.1.4	Sequenzidentität von Cyp4a14	52
3.1.2	Klonierung und heterologe Expression der Cyp4a-Isoformen in <i>Sf9</i> -Insektenzellen	53
3.1.2.1	Spektrale Analyse heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen	53
3.1.2.2	Westernblotanalyse heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen	54
3.1.3	Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften rekombinanter Cyp4a-Isoformen der Maus	56
3.1.3.1	Laurinsäure-Metabolismus heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen	56
3.1.3.2	Arachidonsäuremetabolismus heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen	59
3.1.3.3	Eicosapentaensäuremetabolismus heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen	63
<b>3.2</b>	<b>Nachweis der Expression von Cytochrom P450 4A Isoformen und 20-HETE Bildung in fünf verschiedenen Mausestämmen</b>	<b>68</b>
3.2.1	TaqMan Analyse der mRNA Expression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere	70
3.2.2	Westernblot Analyse der Proteinexpression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere	72
3.2.3	Geschlechts- und stammspezifischer Arachidonsäuremetabolismus in Nierenmikrosomen	73
<b>3.3</b>	<b>Induktion der renalen 20-HETE Produktion durch Androgenbehandlung</b>	<b>75</b>
3.3.1	Androgenbehandlung männlicher NMRI und C57BL/6 Mäuse	75
3.3.2	Androgenbehandlung weiblicher Lewisratten	77
<b>3.4</b>	<b>Gewebespezifische Verstärkung der 20-HETE Bildung durch Überexpression von Cyp4a12a in C57BL/6 Mäusen</b>	<b>79</b>
3.4.1	Taqman-RT-PCR Analyse der mRNA Expression in Herz und Aorta	81
3.4.2	Westernblot Analyse der Proteinexpression in Herz, Aorta, Lunge und Niere	82
3.4.3	Immunhistochemie an Herzschnitten	83
<b>3.5</b>	<b>Inhibition der 20-HETE Produktion durch HET0016</b>	<b>85</b>

3.5.1	Hemmung rekombinanter Cyp4a-Isoformen der Maus durch HET0016	86
3.5.2	Hemmbarkeit des mikrosomalen AA Metabolismus der Maus durch HET0016	88
3.5.2.1	Hemmung des mikrosomalen AA Metabolismus der Mausleber durch HET0016	88
3.5.2.2	Hemmung des mikrosomalen AA Metabolismus der Mausniere durch HET0016	90
3.5.3	Hemmbarkeit des mikrosomalen AA Metabolismus der Rattenniere durch HET0016	91
3.5.4	Hemmbarkeit des mikrosomalen AA Metabolismus der menschlichen Leber durch HET0016	94
<b>3.6</b>	<b>Hemmung der <math>\omega</math>-Hydroxylaseaktivität durch HET0016 bei Uninephrektomie und I/R</b>	<b>95</b>
<b>3.7</b>	<b>Untersuchungen zur Aktivität und Funktion der sEH in verschiedenen Tiermodellen und an rekombinanten Enzymen</b>	<b>98</b>
3.7.1	Stamm- und geschlechtsspezifische sEH Aktivität in der Mausniere	98
3.7.2	ADU Hemmung der Hydrolaseaktivität	99
3.7.3	Lokalisierung der sEH in Kardiomyozyten	101
3.7.4	Stammspezifische Unterschiede der sEH Aktivität in der Ratte	102
3.7.5	Hydrolyse von $\omega$ -3 Epoxy-Fettsäuren durch rekombinante lösliche Epoxidhydrolase	104
3.7.5.1	Chemische Synthese von AA-, EPA- und DHA-Epoxiden	105
3.7.5.2	sEH katalysierte Hydrolyse racemischer Epoxide	108
3.7.5.3	Selektiver Abbau einzelner Enantiomere aus dem Racemat	110
3.7.5.4	Kinetik der sEH katalysierten Hydrolyse der Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP	112
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>114</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung von Cyp4a12a als 20-HETE Synthase der Mausniere</b>	<b>116</b>
4.1.1	Cyp4a12a ist von den in der Niere exprimierten Isoformen die einzige 20-HETE Synthase.	119
4.1.2	Das AA und EPA Metabolitenprofil von Nierenmikrosomen stimmt mit dem von Cyp4a12a überein	121
4.1.3	Die geschlechtsspezifische 20-HETE Bildung stimmt mit der Cyp4a12a Expression überein.	122
4.1.4	Androgene induzieren in der Niere die Expression von Cyp4a12a und die 20-HETE Bildung.	124
<b>4.2</b>	<b>CYP Eicosanoide – ein neues klinisches Target zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen?</b>	<b>125</b>
4.2.1	Pharmakologische Beeinflussung der 20-HETE Bildung und Wirkung	127
4.2.2	Erhöhung des kardio-vaskulären EET-Spiegels durch sEH Hemmung	131
4.2.3	Beeinflussung der Eicosanoid-Balance durch $\omega$ -3 PUFAs	134
<b>5</b>	<b>AUSBLICK: TRANSGENE MAUSMODELLE ZUR ANALYSE DER PATHOPHYSIOLOGISCHEN ROLLE VON 20-HETE</b>	<b>138</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>140</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>152</b>

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>154</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>158</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>159</b>
<b>VORTRÄGE</b>	<b>159</b>
<b>POSTERBEITRÄGE</b>	<b>160</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>161</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>162</b>

## Zusammenfassung

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Fähigkeit von Cytochrom P450 (CYP)-Enzymen Arachidonsäure (AA; C20:4, n-6) durch Hydroxylierung und Epoxidation zu bioaktiven Metaboliten wie 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) und Epoxyeicosatriensäuren (EETs) umzuwandeln. Diese CYP-abhängigen Eicosanoide fungieren als Mediatoren bei der Regulation der Gefäß-, Nieren- und Herzfunktion.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die bisher unbekannte Identität der 20-HETE bildenden CYP-Isoformen in der Mausniere aufzuklären. Ein zweiter Schwerpunkt war die Untersuchung von Veränderungen im CYP-abhängigen Eicosanoid-Stoffwechsel in Tiermodellen des akuten Nierenversagens und der Herzinsuffizienz.

Das experimentelle Vorgehen zur Identifizierung der 20-HETE bildenden CYP-Isoform ging von der Hypothese aus, dass die prinzipiellen Kandidaten Produkte des Cyp4abx-Genclusters im Mausgenom sind. Die dementsprechend durchgeführte Charakterisierung von Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b und Cyp4a14 ergab folgende Ergebnisse hinsichtlich ihrer Substrat- und Wirkungsspezifität sowie ihrer geschlechts- und stammspezifischen Expression:

1. Alle vier Cyp4a-Isoformen bildeten bei heterologer Koexpression mit einer NADPH-CYP Reduktase enzymatisch aktive mikrosomale Enzymsysteme und setzten Laurinsäure (LA; C12:0) mit hoher katalytischer Aktivität um. Die ermittelten Vmax-Werte lagen zwischen 40 und 76 nmol/nmol/min und die Km-Werte zwischen 2 und 16 µM. Als Produkte entstanden 11- und 12-OH-LA, wobei jede Cyp4a-Isoform eine individuelle Regioselektivität aufwies.
2. Cyp4a12a und Cyp4a12b hydroxylierten AA mit hoher katalytischer Effektivität zu 20-HETE. Die Km-Werte lagen bei 25 bzw. 43 µM und die Vmax-Werte bei 8 bzw. 10 nmol/nmol/min. Die Vmax-Werte wurden durch eine stöchiometrische Zugabe von Cytochrom b5 verdoppelt. Cyp4a10 zeigte eine ca. 100-fach geringere AA-Hydroxylaseaktivität. Cyp4a14 bildete geringe Mengen EETs, aber kein 20-HETE.
3. Cyp4a12a und Cyp4a12b, aber nicht Cyp4a10 und Cyp4a14 akzeptierten neben AA auch Eicosapentaensäure (EPA; C20:5, n-3) als effizientes Substrat. Die Km-Werte lagen bei 29 bzw. 41 µM und die Vmax Werte bei 14 bzw. 15 nmol/nmol/min. Überraschenderweise fungierten beide Cyp4a12-Isoformen bei der

EPA Umsetzung nicht nur als Hydroxylasen, sondern auch als Epoxygenasen und bildeten 17,18-Epoxy-EPA als Hauptprodukt.

4. Cyp4a12a und Cyp4a12b unterschieden sich nur in 11 Aminosäurepositionen, zeigten aber eine Reihe wichtiger funktioneller Unterschiede: Das 11- OH-LA:12-OH-LA Verhältnis lag bei 17:83 (Cyp4a12a) bzw. 52:48 (Cyp4a12b). AA wurde durch Cyp4a12a zu 19- und 20-HETE (13:87) und durch Cyp4a12b zu 18-, 19- und 20-HETE (12:10:78) hydroxyliert. Bei der 17,18-Epoxidation von EPA bildete Cyp4a12a vorzugsweise das R,S-Enantiomer, während mit Cyp4a12b beide Enantiomere in gleicher Menge entstanden. Damit bilden die beiden Cyp4a12-Varianten ein interessantes Modell zur Aufklärung der strukturellen Determinanten für die Regio- und Stereoselektivität von Cyp4a-Isoformen.

5. Das renale Expressionsmuster der Cyp4a-Isoformen war geschlechtsspezifisch. In den Nieren weiblicher Tiere der untersuchten Mausstämme (NMRI, FVB/N, Sv129/J, BALB/c, C57BL/6) waren Cyp4a10 und Cyp4a14 hochexprimiert, in Männchen dagegen Cyp4a10 und Cyp4a12a. Eine signifikante Expression von Cyp4a12b in den Nieren beider Geschlechter war nicht nachweisbar. Der Cyp4a12a mRNA Gehalt in Männchen überstieg den in Weibchen 45-fach (NMRI), 88-fach (FVB/N), 40-fach (129Sv/J), 7-fach (BALB/c) und 48-fach (C57BL/6). Die ausgeprägten geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden auch auf Proteinebene mit einem Cyp4a12-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

6. Die Cyp4a12a Expression war bei männlichen Tieren stammspezifisch (NMRI > FVB/N > BALB/c = Sv129/J >> C57BL/6). Die niedrige Cyp4a12a Expression in C57BL/6 Mäusen konnte durch Androgen-Behandlung auf mRNA- und Proteinebene um das 4- bzw. 6-fache gesteigert werden und erreichte so das in NMRI Männchen vorliegende Expressionsniveau.

7. Die AA-Hydroxylaseaktivitäten der isolierten Nierenmikrosomen korrelierten mit den Unterschieden in der Expression von Cyp4a12a auf mRNA- und Proteinebene. Die Weibchen aller Stämme zeigten eine niedrige Kapazität zur 20-HETE Bildung von 15-20 pmol/mg/min. Bei männlichen Mäusen variierte die renale mikrosomale AA-Hydroxylaseaktivität zwischen 100 (NMRI), 45-55 (FVB/N, Sv129/J und BALB/c) und 25 pmol/mg/min (C57BL/6).



Die gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von D. Dragun (Charité, Berlin) durchgeführten Untersuchungen zur Entstehung von akutem Nierenversagen zeigten, dass 20-HETE in der Rattenniere unter Ischämie/Reperfusion (I/R)-Bedingungen freigesetzt und dass der I/R-Schaden durch Hemmung der 20-HETE Bildung signifikant reduziert wird. Für den eingesetzten CYP4A-Inhibitor wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass er die Nieren-mikrosomale 20-HETE Bildung bei Ratten mit einem IC<sub>50</sub> von ca. 20 nM selektiv unterdrückte, während bei Mausnierenmikrosomen und beim rekombinanten Cyp4a12a eine Hemmung erst im mikromolaren Bereich einsetzte.

Die gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von N. Hübner (MDC, Berlin) durchgeführten Untersuchungen zur Herzinsuffizienz zeigten, dass die Entstehung der Herzinsuffizienz im Rattenmodell (SHHF) mit einer Variante des EPHX2 Gens assoziiert ist. EPHX2 kodiert für die lösliche Epoxidhydrolase (sEH), welche den Abbau von EETs katalysiert. Die Genvariation führt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, im Herzen zu einer 3-fachen und in der Niere zu einer 30-fachen Erhöhung der sEH-Aktivität.

Zusammengefasst zeigen die vorgelegten Ergebnisse, dass Cyp4a12a für die  $\omega$ -Hydroxylierung von AA in der Mausniere verantwortlich ist und dass die Expressionshöhe von Cyp4a12a die geschlechts- und stammspezifischen Unterschiede in der 20-HETE Bildung bestimmt. Ausgehend von diesen Befunden wurde eine Cyp4a12a-transgene Mauslinie etabliert, die es zukünftig gestatten wird, die 20-HETE Bildung gewebespezifisch zu verstärken und damit die Rolle dieses CYP-Eicosanoids bei der Entstehung von Gefäß-, Nieren- und Herzerkrankungen unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen. Die darüber hinaus durchgeführten Untersuchungen an den beiden Rattenmodellen unterstreichen die pathophysiologische Bedeutung von Veränderungen in der Biosynthese und dem Abbau von 20-HETE und EETs. Zusammengenommen mit der internationalen Entwicklung auf diesem Forschungsgebiet erscheint es aussichtsreich, den CYP-Eicosanoid Stoffwechsel als neuen Angriffspunkt für die pharmakologische Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zu erschließen.

Schlagworte: Cytochrome P450, Cyp4a, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, 20-Hydroxyeicosatetraensäure, Epoxyeicosatriensäure, lösliche Epoxidhydrolase, Maus, Stamm, Geschlecht, Niere, Herz, Gefäße.

## Abstract

Background: Cytochrome P450 (CYP) enzymes hydroxylate and epoxidize arachidonic acid (AA) to bioactive metabolites such as 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs). These CYP-dependent eicosanoids serve as mediators in the regulation of vascular, renal and cardiac function.

Objectives: The main objective of the present study was to identify the 20-HETE producing CYP isoforms in the mouse kidney. Another focus was to determine changes in the metabolism of CYP-dependent eicosanoids in animal models of acute renal failure and heart failure.

Experimental strategy: To identify the 20-HETE producing CYP-isoform we assumed that the principal candidates are products of the Cyp4abx-gene cluster in the mouse genome. Accordingly, the substrate and reaction specificity of Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b and Cyp4a14, as well as their sex- and strain-specific expression were characterized.

### Results:

1. All four recombinant Cyp4a enzymes were heterologously co-expressed in Sf9-cells together with a NADPH-CYP reductase. They formed enzymatically active microsomal enzyme systems which metabolized lauric acid (LA; C12:0) with high catalytic efficiencies. The V<sub>max</sub>-values ranged between 40 and 76 nmol/nmol/min and the K<sub>m</sub>-values between 2 and 16 μM. The metabolites produced were 11- and 12-OH-LA. Each Cyp4a-isoform was distinguished by an individual regioselectivity.
2. Cyp4a12a and Cyp4a12b hydroxylated AA to 20-HETE with high catalytic efficiencies. The V<sub>max</sub> values reached 8 and 10 nmol/nmol/min and K<sub>m</sub> values were 25 and 43 μM, respectively. Stoichiometric additions of cytochrome b5 resulted in a 2-fold increase of the V<sub>max</sub>-values. Cyp4a10 showed a 100-fold less AA hydroxylase activity. Cyp4a14 produced small amounts of EETs but no 20-HETE.
3. Cyp4a12a and Cyp4a12b, but not Cyp4a10 and Cyp4a14, also accepted eicosapentaenoic acid (EPA) as efficient substrate. K<sub>m</sub> values were 29 and 41 μM and V<sub>max</sub> values 14 and 15 nmol/nmol/min. Surprisingly the Cyp4a12-isoforms did not only hydroxylate EPA but also epoxidized it to 17,18-epoxy-EPA as main product.

4. Cyp4a12a and Cyp4a12b differ only in 11 amino acid positions but showed several important functional differences: The ratio of 11- and 12-OH-LA was 17:83 with Cyp4a12a but 52:48 with Cyp4a12b. AA was hydroxylated by Cyp4a12a to 19- and 20-HETE (13:87) but by Cyp4a12b to 18-, 19- and 20-HETE (12:10:78). The EPA epoxidation was stereoselective with Cyp4a12a which produced mainly the R,S enantiomer, but not with Cyp4a12b. Therefore, these Cyp4a12-variants are an interesting model to elucidate the structural determinants for the regio- and stereoselectivity of the Cyp4a-isoforms.

5. The renal expression pattern of the Cyp4a-isoforms was sex-specific. Analyzing mice from five different strains (NMRI, FVB/N, Sv129/J, BALB/c, C57BL/6), we observed a high expression of Cyp4a10 and Cyp4a14 in females, but of Cyp4a10 and Cyp4a12a in males. There was no significant expression of Cyp4a12b in the kidney of both gender in all strains. The Cyp4a12a mRNA level in males was 45-fold (NMRI), 88-fold (FVB/N), 40-fold (Sv129/J), 8-fold (BALB/c) and 48-fold (C57BL/6) higher than in females. These pronounced differences in the sex-specific expression of Cyp4a12a were also observed at the protein level using a Cyp4a12-specific antibody.

6. The Cyp4a12a expression in male mice was strain-specific (NMRI > FVB/N > BALB/c = Sv129/J >> C57BL/6). The low Cyp4a12a expression at the mRNA and protein level in C57BL/6 mice was induced 4 to 6-fold by treatment with androgens and thereby reached the expression level in NMRI males.

7. The renal microsomal AA-hydroxylase activities correlated with the differences in the expression of Cyp4a12a mRNA and protein. Females of all strains showed a low capacity to produce 20-HETE (15-25 pmol/mg/min). In males, renal AA-hydroxylase activities varied between 100 (NMRI), 44-45 (FVB/N, Sv129/J and BALB/c) and 25 pmol/mg/min (C57BL/6). The capacity to produce 20-HETE was strongly induced by androgen-treatment in C57BL/6 males to 90 pmol/mg/min.

In cooperation with the research group of D. Dragun (Charité, Berlin) we investigated a rat model of renal ischemia/reperfusion (I/R) injury. In this model, I/R triggered the release of 20-HETE and we were able to ameliorate renal injury by pharmacological inhibition of 20-HETE production. The CYP4a-inhibitor used blocked 20-HETE

production in rat renal microsomes selectively with an  $IC_{50}$  of about 20 nM. In contrast, the AA-hydroxylase activities of mouse renal microsomes and that of recombinant Cyp4a12a were not inhibited until micromolar concentrations.

In cooperation with the research group of N. Hübner (MDC, Berlin) we investigated a rat model of heart failure (spontaneously hypertensive heart failure rats, SHHF). The results of the colleagues showed an association of the heart failure phenotype in SHHF with a variant of the EPHX2 gene. EPHX2 is coding for the soluble epoxide hydrolase (sEH) which catalyze the degradation of EETs. Complementing this study, we found that the gene variation leads to significantly higher sEH activities in the heart (3-fold) and in the kidney (30-fold) compared to rat strains not prone to the development of heart failure.

In conclusion, the present study shows that Cyp4a12a is the predominant AA  $\omega$ -hydroxylase in the mouse kidney and that Cyp4a12a expression determines the sex and strain-specific differences in 20-HETE generation. Based on these results we established Cyp4a12a-transgenic mice, which will give us the opportunity to enhance 20-HETE production in a tissue-specific manner and thus to elucidate the role of 20-HETE in the development of vascular, renal and cardiac diseases under *in vivo* conditions. Furthermore, the results obtained on the two rat models emphasize the pathophysiological relevance of changes in the biosynthesis and degradation of 20-HETE and EETs. Taken together with the current rapid progress in the whole research field, it appears promising to develop the CYP-eicosanoid pathway as a novel clinical target for the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: Cytochrome P450, Cyp4a, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, epoxyeicosatrienoic acid, soluble epoxide hydrolase, mouse, strain, gender, kidney, heart, vasculature.

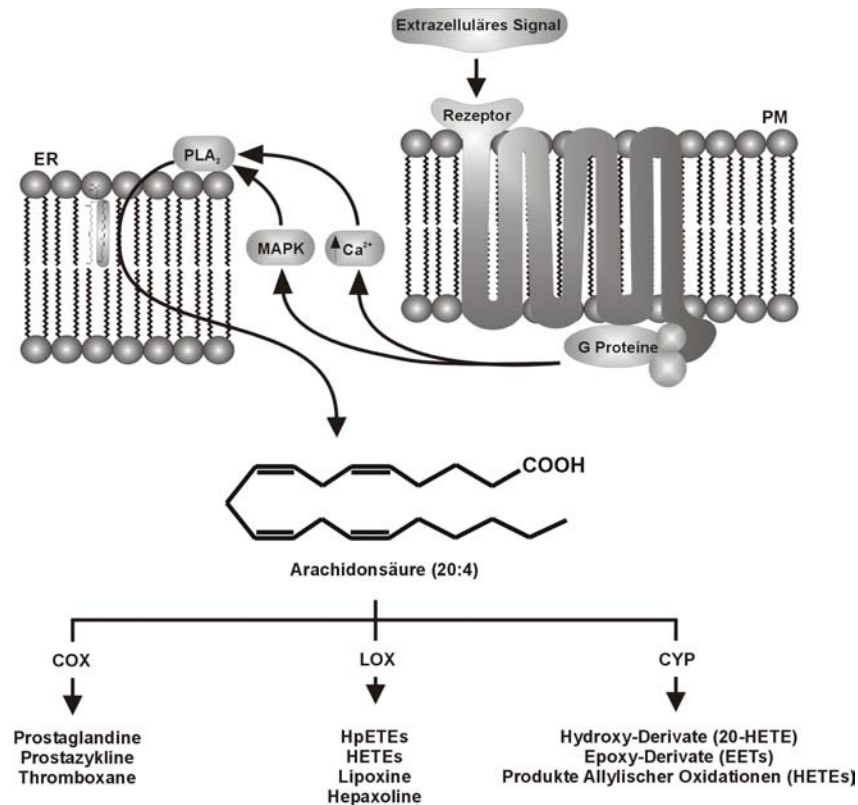
# 1 Einleitung

Cytochrome P450 (CYPs) sind eine Superfamilie von Häm-Thiolat-Proteinen, die in nahezu allen Formen des Lebens vorkommen. Sie akzeptieren eine Fülle von exogenen und endogenen Substanzen als Substrat, im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Isoformen gesättigte oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs), wie beispielsweise Laurinsäure (LA, 12:0) oder Arachidonsäure (AA, 20:4,  $\omega$ -6) und Eicosapentaensäure (EPA, 20:5,  $\omega$ -3). Weiterhin benötigen CYPs molekularen Sauerstoff und Elektronen, um das Substrat metabolisieren zu können. Die von CYPs gebildeten Metabolite agieren als sekundäre Botenstoffe diverser Hormone und Wachstumsfaktoren, die das kardiovaskuläre System, Nieren- und Herzfunktionen regulieren. Diese Metabolite sind Komponenten von Signaltransduktionswegen zur Modulation der Aktivität von Ionenkanälen, Transkriptionsfaktoren und mitogen aktivierten Proteinkinasen. Veränderungen im CYP-abhängigen Fettsäure Metabolismus korrelieren mit kardiovaskulären Erkrankungen, wobei Ursache und Wirkungsbeziehung noch nicht geklärt sind.

## 1.1 Die drei Wege der Arachidonsäure Kaskade

AA wird durch Cyclooxygenasen (COX)-, Lipoxygenasen (LOX)- und CYP-Enzyme zu verschiedenen Klassen von biologisch aktiven Metaboliten umgewandelt, die unter dem Begriff Eicosanoide zusammengefasst werden (Abbildung 1-1). Der Name leitet sich von dem griechischen Wort eicosa (zwanzig) ab und verweist auf die Kettenlänge von AA als dem prinzipiellen Vorläufermolekül der Eicosanoide.

COX-Enzyme initiieren die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen, LOX-Enzyme die von Leukotrienen und anderen Lipid-Mediatoren [1]. Die COX- und LOX-abhängige Stoffwechselwege, die schon Mitte des 20. Jahrhunderts erforscht wurden, sind wichtige Angriffspunkte für klinische Behandlungen von Entzündungen, kardiovaskulären Erkrankungen, Asthma, Fieber und Schmerzen. Heutzutage gibt es eine große Anzahl von Medikamenten, die entweder die Prostaglandin- oder die Leukotrienbildung (COX- und LOX-Inhibitoren) oder ihre Wirkung (Rezeptorantagonisten) beeinflussen. Beispiele hierfür sind nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente, spezifische COX2-Inhibitoren und Leukotrien C4 Antagonisten.



**Abbildung 1-1: Die drei Wege der Arachidonsäure-Kaskade.**

Extrazelluläre Signale induzieren die Freisetzung von AA aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Kernhülle nach Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und anschließender Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) oder anderen Phospholipasen. COX-, LOX- und CYP-Enzyme nutzen freie AA als Substrat, um sie zu verschiedenen Klassen biologisch aktiver Metabolite zu verstoffwechseln.

Die CYP katalysierte Hydroxylierung und Epoxidation von AA wurde erst 1981 entdeckt [2, 3, 4, 5] und als so genannter dritter Zweig der AA Kaskade etabliert. Physiologisch wichtige Metabolite sind 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) und eine Reihe von regio- und stereoisomeren Epoxy-Eicosatriensäuren (EETs). Jüngste Studien legen eine wichtige physiologische und pathophysiologische Rolle dieser Metabolite nahe. Diese Entwicklung forciert die Bemühungen, den CYP Zweig der AA Kaskade als Angriffspunkt für klinische Behandlungen zu erschließen, ähnlich wie schon früher den COX- und LOX-abhängigen Zweig.

## 1.2 Struktur und Funktion von Cytochrom P450-Enzymen und ihre Rolle im Arachidonsäure Metabolismus

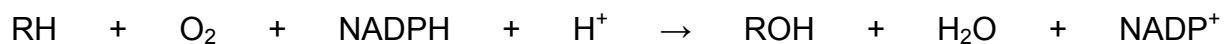
### 1.2.1 Spektrale und katalytische Eigenschaften von Cytochrom P450-Enzymen

CYP Proteine haben ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und tragen ein Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe. Die Schwefelgruppe eines Cysteins dient als 5ter Ligand des Häm-Eisens. Dieses Häm-bindende Cystein befindet sich in der C-terminalen Region mit einer Reihe invarianter Aminosäuren, die für die gesamte CYP Superfamilie charakteristisch sind:

**F**      **X**      **X**      **G**      **X**      **B**      **Z**      **C**      **X**      **G**

(das Häm-bindende Cystein ist unterstrichen; **B** = basischer Rest, **Z** = hydrophober oder neutraler Rest, **X** = beliebiger Aminosäurerest). Diese Art der Häm-Bindung ist eine wichtige Voraussetzung zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff. Gleichzeitig ist sie verantwortlich für die namens gebende spektrale Eigenschaft der CYP-Proteine (P450), die in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts als Pigmente definiert wurden, die ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigen, nachdem sie Kohlenmonoxid als 6ten Liganden des reduzierten Häm-Eisens binden [6].

CYP-Enzyme sind Monooxygenasen und katalysieren Reaktionen nach folgendem Schema:



Je nach der Struktur des chemischen Substrates (RH) kann im Ergebnis der Übertragung des aktivierten Sauerstoffatoms eine Hydroxylierung oder Epoxidation oder auch eine O-, N- oder S-Dealkylierung erfolgen.

### 1.2.2 Cytochrom P450 Systeme und ihr Reaktionszyklus im endoplasmatischen Retikulum

Alle momentan bekannten AA metabolisierenden CYP-Isoformen sind **integrale Membranproteine**, die mittels einer hydrophoben N-terminalen Sequenz im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verankert sind (Abbildung 1-2A). Der Rest des CYP Moleküls bildet eine große zytosolische Domäne, die die prosthetische Gruppe mit dem Häm-Eisen umschließt. Einige hydrophobe Regionen der zytosolischen Domäne befinden sich direkt an der Membranoberfläche. Dadurch könnte für die aus

Die **Aktivierung des molekularen Sauerstoffs** am Häm-Eisen des CYP erfordert die Übertragung von zwei einzelnen Elektronen (Reaktionszyklus in Abbildung 1-2B). Die Elektronen werden von NADPH zur Verfügung gestellt und von der NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Reduktase (CPR), die FAD und FMN als prosthetische Gruppen enthält, in zwei Schritten auf das CYP übertragen (Abbildung 2A und B). Der Transfer des ersten Elektrons auf das Häm-Eisen ermöglicht die Bindung von molekularem Sauerstoff, der durch den zweiten Elektronentransfer dann weiter aktiviert wird.



B: Vereinfachtes Schema des CYP-katalysierten Reaktionszyklus. R-Substrat, NO-Stickstoffmonoxid, CO-Kohlenmonoxid, Fe-Häm-Eisen; eine detaillierte Beschreibung findet sich im Text.

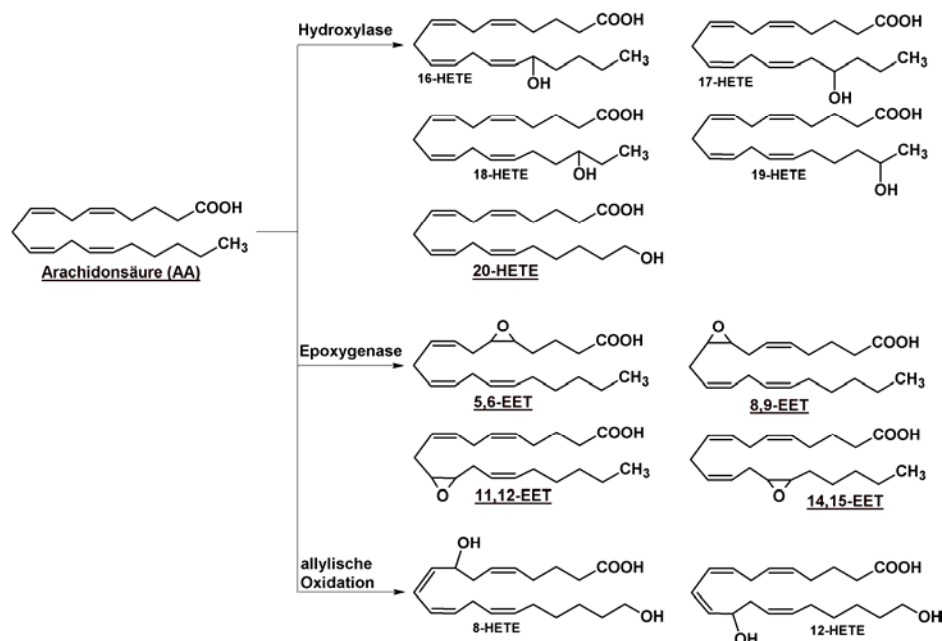
4



Die Gestalt des Substratbindungskanal, die durch die jeweils den Substratbindungskanal bildenden Aminosäuren und ihre räumliche Anordnung determiniert ist, führt bei den unterschiedlichen CYP-Isoformen zu einer individuellen **Substratspezifität**. Die räumliche Orientierung des Substrats zum aktivierten Sauerstoff am Häm-Eisen ist für die Regio- und Stereoselektivität der Produktbildung entscheidend.

### 1.2.3 Reaktionstypen und Primärprodukte des Cytochrom P450-abhängigen Arachidonsäure Metabolismus

CYP-Enzyme produzieren biologisch aktive AA Metabolite durch Katalyse von Hydroxylierungs- oder Epoxidationsreaktionen (Abbildung 1-3) [7, 8].



**Abbildung 1-3: Reaktionstypen und prinzipielle Produkte des Cytochrom P450-abhängigen Arachidonsäure Metabolismus.**

CYPs metabolisieren Hydroxylierungs-, Epoxidations- und allylische Oxidationsreaktionen. Dabei entstehen eine Reihe von regioisomeren Hydroxy-Eicosatetraensäuren (HETEs) und Epoxy-Eicosatriensäuren (EETs).

Die **Hydroxylierung** von AA kann zur Bildung von 16- bis 20-HETE führen, abhängig von der Regioselektivität der jeweiligen CYP-Isoform. 16- bis 19-HETE können als R- oder S- Enantiomere gebildet werden.

Bei der **Epoxidation** werden die Doppelbindungen der AA durch den aktivierten Sauerstoff angegriffen. Diese Reaktion führt zu 4 Regioisomeren (5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET) und ihren Stereoisomeren (R,S und S,R).

Weiterhin katalysieren CYP-Enzyme **allylische Oxidationen** von AA, ein Reaktionstyp ähnlich dem von LOX-Enzymen. Mögliche Metabolite sind hierbei 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13- und 15-HETE. Eine charakteristische Eigenschaft dieser subterminalen HETEs ist die Dienol-Funktion, die von der Doppelbindungsverschiebung während der Reaktion herrührt.

#### 1.2.4 Arachidonsäure metabolisierende Cytochrom P450-Isoformen und ihre orthologen Gene bei Nagern und Menschen

CYP-Enzyme sind das Produkt einer der größten Gen-Superfamilien, die je in der Biologie beschrieben wurden. Die Anzahl funktioneller CYP-Gene in Säugergenomen reichen von 102 in der Maus und mehr als 60 in der Ratte bis zu 57 in Schimpanse und Mensch und 54 im Hund.

Die **Nomenklatur** der CYPs erfolgt anhand von Sequenzhomologien: Bei einer Übereinstimmung der Sequenz von mehr als 40 % bilden CYP Proteine eine Familie, die mit einer Nummer gekennzeichnet ist (Bsp.: CYP2 oder CYP4). Unterfamilien werden bei 55 % Übereinstimmung gebildet und mit Buchstaben gekennzeichnet (z. B. CYP2C, CYP2J, CYP4A oder CYP4F). Individuelle Mitglieder dieser Unterfamilien werden wiederum mit einer Nummer gekennzeichnet (Bsp.: CYP2C8, CYP2C9 oder CYP4A11, CYP4A22).

Die meisten **AA-metabolisierenden CYP-Isoformen** gehören zu den Subfamilien 1A, 2C, 2E, 2J, 4A und 4F (Tabelle 1-1). CYP2C- und CYP2J-Enzyme epoxidieren dabei AA zu EETs und sind die wichtigste Quelle für diese Metaboliten im kardiovaskulären System. Im Gegensatz dazu hydroxylieren CYP4A und CYP4F-Enzyme AA und bilden 20-HETE in der Niere, den Blutgefäßen und anderen Geweben.

**Orthologe Gene** existieren in der CYP Superfamilie nur in eingeschränkter Form. Die Mitglieder einiger Subfamilien haben sich in den verschiedenen Spezies unterschiedlich entwickelt (Tabelle 1-1) [9]. Dies führt zu einem Unterschied in der Anzahl der einzelnen Isoformen, zum anderen können sich aber auch

unterschiedliche Substratspezifitäten der Isoformen entwickelt haben. Generell kann dieses Problem nur durch Sequenz- und Funktionsanalyse, kombiniert mit einer Analyse der gewebs- und geschlechtsspezifischen Expression gelöst werden.

**Tabelle 1-1: Funktionelle CYP-Gene im Genom von Maus, Ratte und Mensch und mögliche AA Hydroxylasen und Epoxygenasen.**

	Maus		Ratte		Mensch		Funktion
	Anzahl der Gene <sup>*</sup>	EET- und HETE-Synthasen <sup>#§</sup>	Anzahl der Gene <sup>*</sup>	EET- und HETE-Synthasen <sup>#§</sup>	Anzahl der Gene <sup>*</sup>	EET- und HETE-Synthasen <sup>#§</sup>	
CYPs	102		>60		57		Funktionelle CYP-Gene im Genom
CYP4A	4	?	4	-1, -2, -3, -8	2	-11	Potentielle 20-HETE Synthasen <sup>§</sup>
CYP4F	9	?	9	?	6	-2, -3A	
CYP2C	15	-44, +?	7	-11, -23	4	-8, -9	Potentielle EET-Synthasen <sup>§</sup>
CYP2J	8	?	2	-3	1	-2	
CYP1A	2	-1, -2	2	-1, -2	2	-1, -2	Potentielle subterminale Hydroxylasen
CYP2E	1	-1	1	-1	1	-1	

<sup>\*</sup> Ist die Gesamtanzahl der CYP-Gene im Genom oder die Anzahl der CYP-Gene einer bestimmten Subfamilie.

<sup>#</sup> Ist der Name der spezifischen Isoform einer CYP-Subfamilie, von der bekannt ist, dass sie in den AA-Stoffwechsel involviert ist, z.B. 12a steht für die Isoform Cyp4a12a.

<sup>§</sup> 20-HETE-Synthase und EET-Synthase sind gebräuchliche Trivialnamen. Es handelt es sich nicht um Synthasen im biochemischen Sinne, sondern um AA-Hydroxylasen, die 20-HETE bilden, und AA-Epoxygenasen, die EETs bilden.

### 1.2.5 Cytochrome P450 4A sind AA-Hydroxylasen

Wie bereits erwähnt, können CYP4A-Enzyme AA hydroxylieren und damit 20-HETE bilden. In Tabelle 1-2 sind die wichtigsten Vertreter dieser Familie, ihre Expression und die gebildeten AA Metabolite aufgeführt.

Im **Menschen** existiert nur eine funktionelle CYP4A-Isoform: CYP4A11 [10]. CYP4A11 hydroxyliert AA zu 20-HETE. CYP4A11-Immuninhibitionen an humanen Nierenmikrosomen zeigten, dass die renale 20-HETE Bildung zu 32 % von CYP4A11 herrührt [11].

In der Niere der **Ratte** werden vier CYP4A-Isoformen exprimiert. Untersuchungen an rekombinanten Enzymen zeigen, dass alle Isoformen, CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3

und CYP4A8, AA zu 20-HETE hydroxylieren. CYP4A1 zeigte dabei eine 10-fach höhere Aktivität gegenüber AA als CYP4A2 und CYP4A3. CYP4A8 besitzt die geringste AA-Hydroxylase Aktivität [12, 13, 14, 15]. CYP4A2 und CYP4A3 besitzen auch die Fähigkeit, AA zu EETs zu epoxidieren [14, 15]. CYP4A1 ist niedrig und CYP4A2 konstitutiv und hoch exprimiert in Niere, Leber und Vaskulatur [16]. CYP4A2 und CYP4A3 sind in allen Segmenten des Nephrons nachweisbar, CYP4A8 nur in den corticalen Bereichen. CYP4A1 konnte nur in der Gesamtniere nachgewiesen werden. Die Expression der CYP4A-Isoformen ist geschlechtsspezifisch [17] und altersabhängig [18].

**Tabelle 1-2: CYP4A  $\omega$ -Hydroxylasen [19].**

Spezies	CYP	AA-Metabolite	Expression in
Ratte	4A1	19-/20-HETE	Niere, Leber, Hirn
	4A2	19-/20-HETE, EETs	Niere, Leber, Hirn, Vaskulatur, Lunge
	4A3	19-/20-HETE, EETs	Niere, Leber, Hirn, Vaskulatur, Lunge
	4A8	19-/20-HETE	Niere, Leber, Hirn
Kaninchen	4A4	20-HETE, PGE-OH	Niere, Leber, Lunge
	4A5	-	Leber
	4A6	20-HETE	Niere, Leber
	4A7	20-HETE	Leber
Mensch	4A11	19-/20-HETE	Niere, Leber
Maus	4a10	?	Niere, Leber,
	4a12a	?	Niere, Leber
	4a12b	?	Lunge
	4a14	?	Niere, Leber

HETE: Hydroxyeicosatetraensäure, EET: Epoxyeicosatriensäure, PGE-OH: Hydroxy-Prostaglandin E.

Eine gewebs- und geschlechtsspezifische Expression der Cyp4a-Isoformen ist auch in der **Maus** nachgewiesen worden. Wie die vorliegende Arbeit und andere Autoren zeigen, exprimieren weibliche Tiere in der Niere Cyp4a10 und Cyp4a14, männliche Tiere Cyp4a10 und Cyp4a12a. Die Expression der Isoformen ist zudem gewebespezifisch in unterschiedlichen Segmenten des Nephrons [20, 21]. Die enzymatischen Eigenschaften der Cyp4a-Isoformen der Maus sind noch nicht bekannt. Knockout Mäuse für die Gene Cyp4a14 und Cyp4a10 zeigen aber einige interessante Befunde. Cyp4a14 knockout Mäuse (Cyp4a14 (-/-)) entwickeln Bluthochdruck, wobei Männchen stärker betroffen sind als Weibchen. Es wurde gezeigt, dass die männlichen Tiere erhöhte Plasma-Androgenwerte aufweisen und

eine erhöhte Cyp4a12 Expression und 20-HETE Bildung in der Niere zeigen. Dies deutet auf eine Regulation der 20-HETE Bildung durch Androgen hin [20]. Cyp4a10 knockout Mäuse (Cyp4a10 (-/-)) sind normotensiv, entwickeln jedoch salz-sensitiven Bluthochdruck [22].

### **1.3 Cytochrom P450-abhängige Eicosanoidbildung und – wirkung im physiologischen und pathophysiologischen Kontext**

#### **1.3.1 Arachidonsäurefreisetzung und CYP-abhängig gebildete Metabolite als sekundäre Botenstoffe**

Unter Basalbedingungen liegt AA hauptsächlich verestert an der sn2 Position von Glycerophospholipiden vor. Für die CYP-abhängige Bildung von Eicosanoiden muss AA jedoch in ihrer freien Form vorliegen. Die **Freisetzung von AA** erfolgt durch die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) durch ein extrazelluläres Signal aktiviert wird (Abbildung 1-1). Die cPLA<sub>2</sub> bindet Ca<sup>2+</sup>-Ionen und transloziert zur Kernmembran und zum ER. cPLA<sub>2</sub> kann auch durch Phosphorylierung durch zell- und kontextspezifische Kinasen aktiviert werden. Alternativ kann AA auch in zwei aufeinander folgenden Schritten durch die Phospholipase C und die Diacylglycerol Lipase freigesetzt werden. In entzündeten Geweben kann die Freisetzung von AA durch hoch aktive sekretorische Phospholipasen erfolgen.

Die Notwendigkeit der Phospholipase Aktivierung und der anschließenden AA Freisetzung zeigt die Rolle der CYP-abhängig gebildeten Metabolite als **sekundärer Botenstoff** für diverse Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Primäre extrazelluläre Signale, von denen bekannt ist, dass sie zu EET und/oder 20-HETE Bildung führen sind beispielsweise Bradykinin und Acetylcholin (vasodilatorische Hormone), Angiotensin II (Ang II), Endothelin-1, Norepinephrin und Dopamin (vasokonstriktiv und zellproliferativ wirkende Hormone, bzw. Hormone, die tubuläre Nierenfunktionen modulieren) [19].

### 1.3.2 CYP-abhängig gebildete Metabolite im zellulären und physiologischen Kontext

Jede Zell- oder Gewebeart hat ihre eigene Zusammenstellung von GPCRs, Phospholipasen, Eicosanoid-generierenden Enzymen und finalen Effektoren. Zwei Beispiele sollen die Wichtigkeit des **zellulären Kontexts** verdeutlichen.

EETs werden in Endothelzellen (EC) nach Aktivierung der cPLA2 durch den Bradykininrezeptor gebildet. Sie wirken dann als parakrine Faktoren und führen zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) durch Aktivierung des Calcium-abhängigen Kalium (BK) Kanals [23].

EETs werden auch in den EC der Sammelrohre in der Niere gebildet. Dort wird die Phospholipase durch Bindung von Adenosin an den (A1) Adenosin Rezeptor aktiviert. Die EETs inhibieren hier den epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) und führen dadurch zu einer verringerten Salzresorption [24].

Das letzte Beispiel zeigt ebenfalls, wie die unterschiedlichen Signalkomponenten in Anpassung an die **physiologischen Bedürfnisse** reguliert werden können. Bei Salz-mangel wird der ENaC stark hochreguliert und die Expression der EET-bildenden Isoform (CYP2C23 in der Ratte) wird unterdrückt. Das Gegenteil tritt bei hoher Salzbelastung auf: Induktion von CYP2C23, Inhibition und Repression von ENaC [25].

### 1.3.3 CYP-abhängig gebildete Metabolite im pathophysiologischen Kontext am Beispiel von Ischämie/Reperfusion

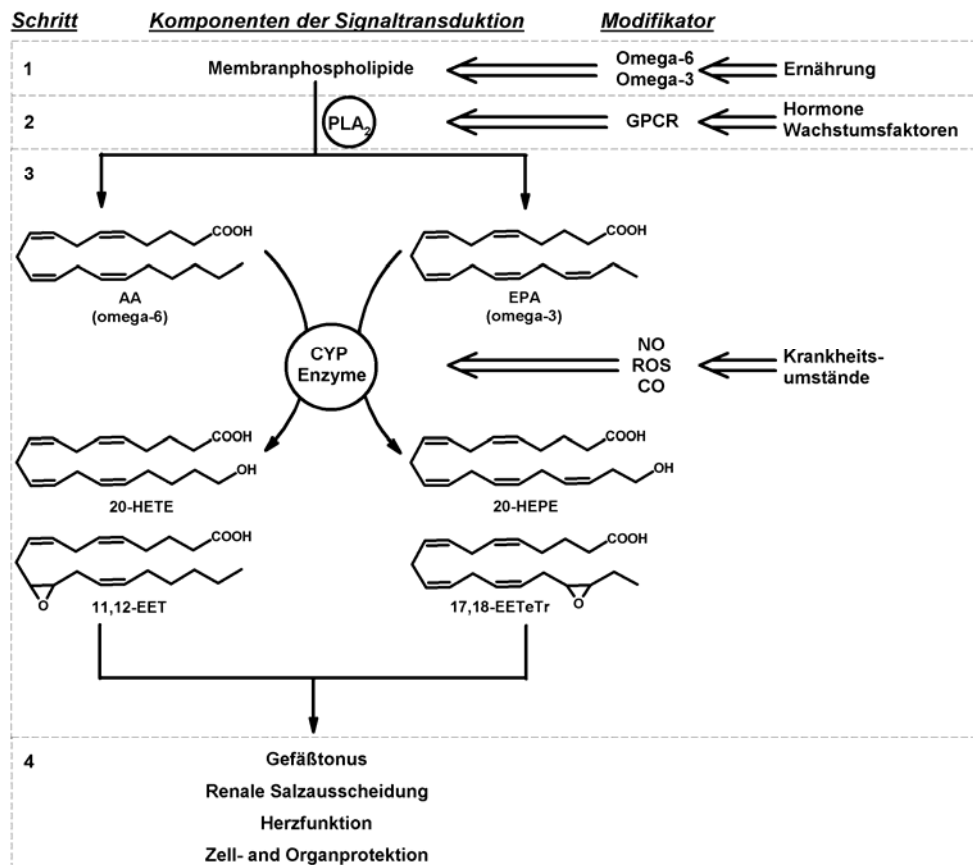
Wie EETs und 20-HETE mit dem plötzlichen Auftreten pathophysiologischer Bedingungen in Verbindung stehen könnten, wird hier am Beispiel von Ischämie/Reperfusion (I/R) beschrieben. Nach unserem momentanen Verständnis werden CYP-abhängige Eicosanoide nach ihrer Synthese teilweise in Phospholipide eingebaut [26, 27]. Auf diesem Weg wird ein Pool „inaktiver“ Eicosanoide angelegt, der bei Bedarf aktiviert und verwendet werden kann. Dieser Mechanismus erlaubt das Umgehen einer Neusynthese, die nur unter sauerstoffreichen Bedingungen möglich ist, da CYP-Enzyme Oxygenasen sind. Unter ischämischen Bedingungen bietet dieser Membranpool, der unter normalen sauerstoffhaltigen Bedingungen etabliert wurde, den einzig möglichen Zugang zu EETs und 20-HETE. Ischämie und

$\text{Ca}^{2+}$ -Überladung lösen Phospholipase Aktivierung aus. Daher hat die Möglichkeit sich zwischen veresterter und freier Form befindlicher EETs und 20-HETE eine hohe physiologische Relevanz.

#### **1.4 Modulation der Cytochrom P450-abhängigen Bildung von Eicosanoiden durch systemische und gewebespezifische Faktoren**

CYP-abhängige Eicosanoide werden als Sekundärbotenstoffe nach Freisetzung von AA durch ein extrazelluläres Signal gebildet. Es existieren aber weitere wichtige Modulatoren, die je nach Ernährung, zellulärem Kontext und Krankheitsbild ins Spiel kommen (Abbildung 1-4).

AA (20:4,  $\omega$ -6) gehört zu der Gruppe der  **$\omega$ -6 PUFAs** (Doppelbindung 6 C-Atome vom terminalen C-Atom entfernt). Säuger besitzen nicht die für das Einfügen der  $\omega$ -6 Doppelbindung erforderliche Desaturase. Daher gehören AA und ihr Vorläufer Linolsäure (18:2,  $\omega$ -6) zu den essentiellen Fettsäuren, die nur über die Nahrung verfügbar sind; Linolsäure hauptsächlich über pflanzliche und AA über tierische Nahrung. Eine weitere Gruppe essentieller Fettsäuren sind die  **$\omega$ -3 PUFAs**, deren physiologisch wichtigste Vertreter EPA (20:5,  $\omega$ -3) und Dokosahexaensäure (DHA, 22:6,  $\omega$ -3) sind. Als Vorläufer von EPA und DHA kann  $\alpha$ -Linolensäure (18:3,  $\omega$ -3) dienen, die unter anderem in grünem Blattgemüse zu finden ist. Da dieser Stoffwechselweg sehr ineffektiv ist, ist eine direkte Ernährung mit EPA und DHA wichtig (Abbildung 1-4, 1). Öliger Fisch und andere Meeresfrüchte sind aufgrund der Nahrungskette im Meer, die bei  $\omega$ -3 PUFA produzierendem Plankton beginnt, reich an EPA und DHA.  $\omega$ -6 und  $\omega$ -3 PUFAs sind nicht ineinander umwandelbar, da es keine  $\omega$ -3 Desaturase in Säugern gibt. Daher ist entscheidend, in welchem Verhältnis diese essentiellen Fettsäuren dem Organismus über die Nahrung zur Verfügung gestellt werden. Einige Organe haben spezielle Mechanismen zur Aufnahme und Umwandlung von  $\omega$ -3 PUFAs (insbesondere DHA) entwickelt. Dies ist wichtig für die normale Funktionsfähigkeit des Gehirns und der Retina und eventuell auch des Herzens. Essentielle Fettsäuren kompetieren um den Einbau in Membranphospholipide, aber auch als Substrat für CYP-Enzyme.



**Abbildung 1-4: Bildung und Funktion Cytochrom P450 abhängiger Eicosanoide im kardiovaskulären System.**

- 1) Ernährungsbedingte Aufnahme essentieller Fettsäuren und zelltyp-spezifische Inkorporation in Membranphospholipide.
- 2) AA oder  $\omega$ -3 PUFAs wie EPA werden durch die PLA<sub>2</sub> freigesetzt, die durch verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren über GPCR aktiviert wird.
- 3) Freie AA und EPA kompetieren um die Umsetzung durch CYP-Enzyme. Die zellspezifische Expression von CYP4A/F- und CYP2C/J-Enzymen führt zu spezifischen regio- und stereoselektiven Metaboliten. CYPs werden durch NO und CO inhibiert. ROS können mit NO reagieren, was zu NO-Mangel führt und CYP-Enzyme unter verschiedenen Krankheitsbedingungen demaskiert.
- 4) CYP-abhängige Eicosanoide dienen als Sekundärbotenstoffe in Signalwegen, die Gefäß-, Nieren- und Herzfunktionen regulieren. Einzelne Eicosanoide modulieren (i) die Aktivität von Ionenkanälen, die das Membranpotential oder die Salzresorption regulieren, und (ii) die Aktivierung von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren und mitogen-aktivierten Proteinkinasen.

CYP-Enzyme werden durch **Stickstoffmonoxid** inhibiert (Abbildung 1-2B; Abbildung 1-4, 3). So ist die Wirkung von EETs als EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor) erst nach pharmakologischer Hemmung der NO-Synthase [23] oder bei endothelialer Dysfunktion zu sehen [28, 29], bei der auch die 20-HETE Bildung demaskiert wird [30, 31].



**Kohlenstoffmonoxid** ist der klassische Testligand für das Häm-Eisen und ein starker Inhibitor von CYP-Enzymen (Abbildung 1-2B; Abbildung 1-4, 3). Häm-Abbau durch die Hämoxygenase (HO), die bei Entzündungsreaktionen induziert wird, ist die größte endogene Quelle für CO [32]. HO-1 limitiert möglicherweise auch die Verfügbarkeit von Häm für die CYP Biosynthese. Zudem sind sowohl HO-1 als auch CYP in ihrer Aktivität vom Elektronentransfer desselben Redox-Partners (CPR) abhängig.

**Reaktive Sauerstoffspezies** (ROS,  $O_2^-$  in Abbildung 1-2B; Abbildung 1-4, 3) sind hoch aktiv und können sowohl das CYP-Enzym selbst, als auch die Membranlipide in der Umgebung zerstören.  $O_2^-$  kann mit NO zu Peroxynitrit reagieren, das einerseits die Tyrosin- und Cystein-Reste der CYP und CPR Proteine direkt angreifen kann [33, 34, 35, 36, 37]. Andererseits reagiert  $O_2^-$  mit NO zu Peroxynitrit und trägt so zu einem NO-Mangel bei, der zu einer Demaskierung sonst durch NO gehemmter CYP-Enzyme führt.

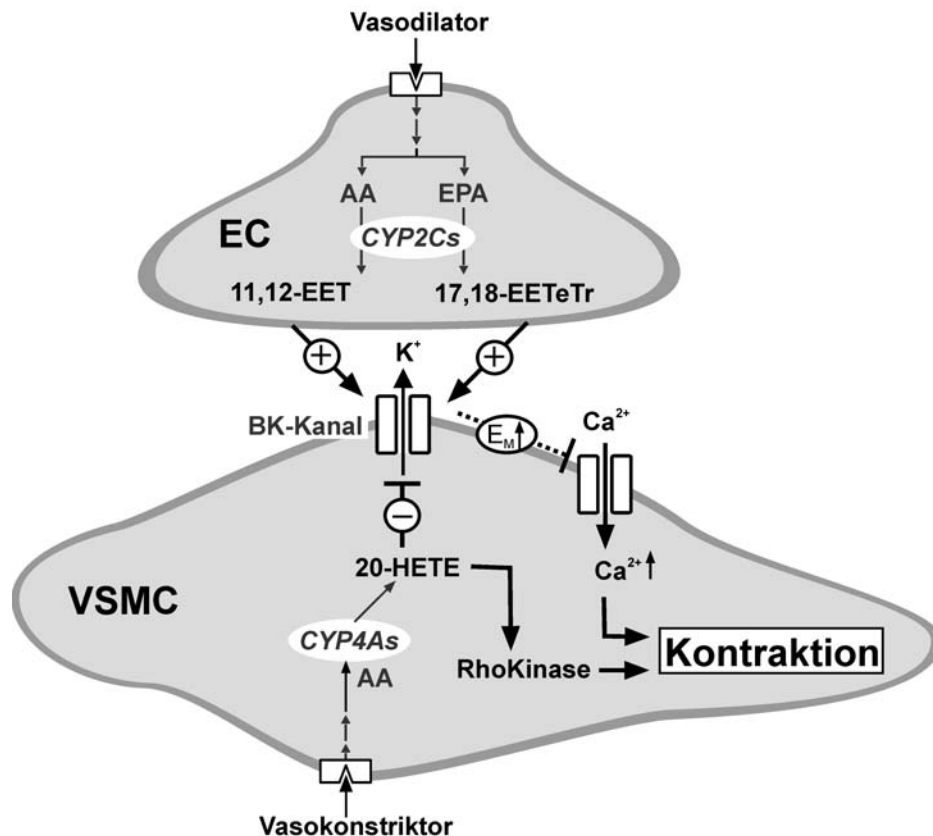
## 1.5 Biologische Wirkung von 20-HETE und EETs

EETs und 20-HETE dienen als Sekundärbotenstoffe zahlreicher Hormone und Wachstumsfaktoren und besitzen unterschiedlichste biologische Aktivitäten in Abhängigkeit vom extrazellulären Signal, das ihre Bildung auslöst. Da das Primärziel, bzw. der Rezeptor der CYP-abhängigen Eicosanoide noch nicht bekannt ist, gibt es noch keine systematische Untersuchung der biologischen Effekte. Die meisten Effekte, die im Folgenden diskutiert werden, sind Auswirkungen auf intermediäre Signalkomponenten oder finale Effektoren oder auch physiologische Gesamtantworten.

### 1.5.1 Regulation des Gefäßtonus

EET zeigen EDHF-ähnliche Eigenschaften. Sie werden in EC als Reaktion auf vasodilatorische Hormone gebildet und aktivieren anschließend den BK Kanal in den darunter liegenden VSMC (Abbildung 1-5) [23]. Die Aktivierung des BK Kanals führt zu  $K^+$  Ausstrom und Hyperpolarisierung des Membranpotentials. Als ein Ergebnis davon wird der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle inhibiert und damit die  $Ca^{2+}$  induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung vom sarkoplasmatischen Retikulum

reduziert. Letztendlich resultiert dieser Signalweg in einer Entspannung der VSMC. Die Relevanz dieses Signalwegs sowohl für EET-vermittelte Vasodilatation als auch die generelle Signifikanz der EETs im gesamten Gefäßsystem wird gegenwärtig intensiv untersucht [38, 39, 40].



**Abbildung 1-5: Rolle der Cytochrom P450-abhängig gebildeten Eicosanoide bei der Regulation des Gefäßtonus.**

EETs werden in EC von CYP2C- und CYP2J-Enzymen als Antwort auf vasodilatorische Hormone gebildet. EETs aktivieren den BK-Kanal in VSMC. Die Aktivierung des BK-Kanals resultiert in einer Hyperpolarisation der Membran, reduziertem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und letztendlich in der Relaxation der VSMC. 20-HETE wird von CYP4A- und CYP4F-Enzymen in den VSMC als Antwort auf vasokonstriktive Hormone gebildet. 20-HETE vermittelt die Vasokonstriktion durch Inhibition des BK-Kanals und Aktivierung der Rho-Kinase. Abhängig von der Ernährung kommen  $\omega$ -3 PUFA wie EPA als alternative Substrate für die CYP-Enzyme in Betracht. Daraus resultiert die Bildung eines potenten BK-Kanal Aktivators wie 17,18-Eicosatetraensäure (17,18-EETeTr) sowohl in den EC als auch in den VSMC.

20-HETE spielt eine entgegengesetzte Rolle und vermittelt Vasokonstriktion. Es gibt scheinbar zwei Mechanismen: (i) die Inhibition von BK Kanälen [41, 42] und (ii) die Aktivierung der Rho-Kinase [43]. Eine Inhibition der BK-Kanäle führt über dieselben Komponenten, die für die EETs beschrieben wurden, zu einem erhöhten

intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Level und zu Vasokonstriktion. Die 20-HETE vermittelte Rho-Kinase Aktivierung führt zu Phosphorylierung und Inaktivierung der MLC (leichten Myosinketten)-Phosphatase. Dies führt zu einer erhöhten MLC Phosphorylierung und damit zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des kontraktile Apparates.

In renalen Mikrogefäßen vermittelt 20-HETE die Entwicklung des Gefäßtonus und hilft auf diese Weise, den Blutfluss in Wechselwirkung mit Änderungen im Perfusionsdruck konstant zu halten. Außerdem vermittelt 20-HETE das Tubuloglomerulären Feedback, d.h. die Anpassung des Blut- und Urinflusses in der Niere [42].

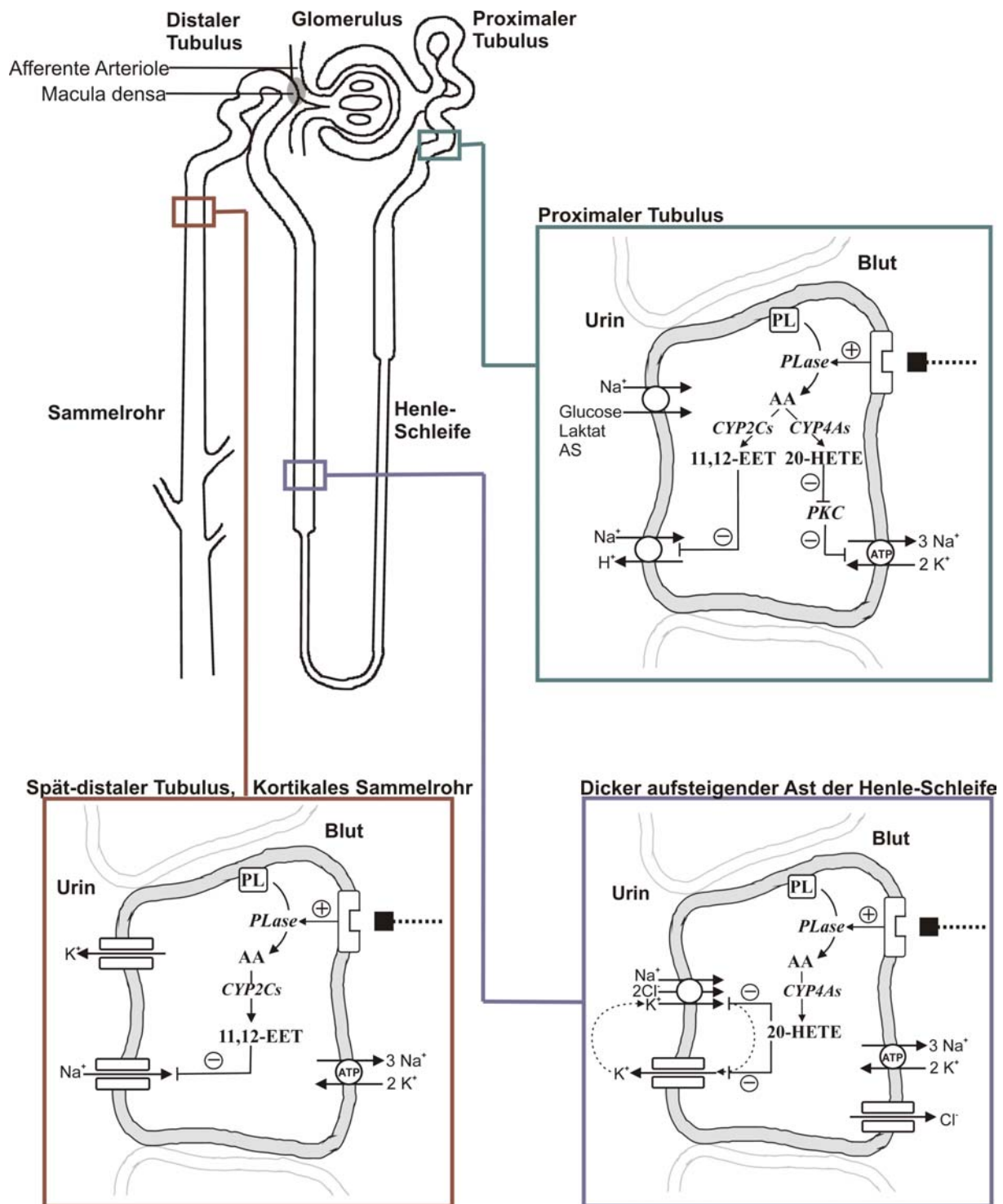
### 1.5.2 Regulation der Tubulusfunktionen in der Niere

20-HETE und EETs werden in verschiedenen Segmenten des Nephrons gebildet [19, 42]. Ihr Nettoeffekt ist die Inhibition der Salzresorption (Abbildung 1-6).

Im **proximalen Tubulus** inhibiert 20-HETE die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase durch Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung. EETs verhindern hier die Natrium Resorption durch Inhibition des  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauschers. 20-HETE und EETs vermitteln den Effekt freier AA, die als Antwort auf Stimuli wie Dopamin und Parathyroidhormon freigesetzt wird.

Im dicken aufsteigenden Ast der **Henle'schen Schleife** (TALH) wird der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  Kotransporter durch 20-HETE inhibiert. Die Bildung von 20-HETE im TALH wird durch verschiedene extrazelluläre Signale wie Ang II, Bradykinin und  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert.

In den kortikalen **Sammelrohren** sind EETs Sekundärbotenstoffe von Adenosin und eventuell auch anderen Faktoren und dienen als Inhibitoren des ENaC, der eine vorherrschende Rolle bei der Natrium Resorption in diesem Teil des Nephrons spielt [24, 25].



**Abbildung 1-6: Rolle der Cytochrom P450-abhängig gebildeten AA Metabolite im tubulären System der Niere.**

20-HETE und EETs werden in verschiedenen Teilen des Nephrons gebildet und modulieren die Aktivität von Ionenkanälen, die in die Salzresorption involviert sind. Der Nettoeffekt ist eine Verstärkung der Salzausscheidung. Weitere Details sind im Text beschrieben.

### 1.5.3 Regulation der Herzfunktion

Im Herzen sind EETs und 20-HETE an der Regulation von verschiedenen Ionenkanälen beteiligt [44, 45, 46, 47].

An isolierten Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass EETs den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die Kontraktion induzieren [47, 48]. In isolierten Herzen führt ein erhöhter EET-Spiegel bei Ischämie zu einer verbesserten kardialen Erholung in der folgenden Reperfusionsphase. Dabei scheint die Aktivierung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals essentiell für die funktionelle Erholung zu sein [49, 50, 51].

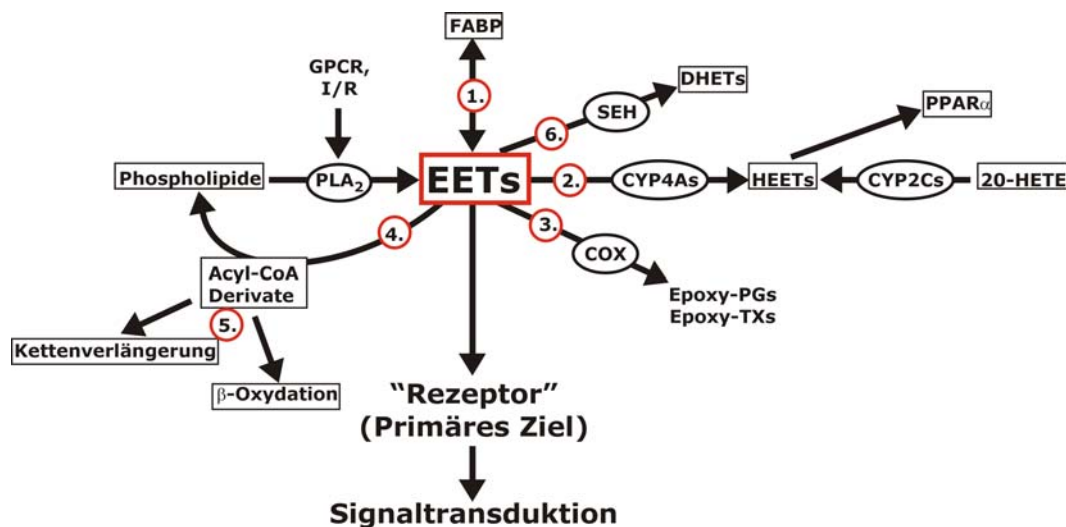
20-HETE zeigt schädliche Effekte unter den gleichen Bedingungen. I/R-induzierter Myokardinfarkt in Kaninchen- und Rattenherzen wird signifikant verbessert durch Vorbehandlung mit Inhibitoren der 20-HETE Synthasen oder 20-HETE Antagonisten. 20-HETE scheint den sarkolemmalen  $\text{K}_{\text{ATP}}$  Kanal zu hemmen, sodass eine Inhibition der 20-HETE Bildung vermutlich in einer Öffnung des sarkolemmalen  $\text{K}_{\text{ATP}}$  Kanals resultiert [52, 53, 54].

### 1.6 Sekundärproduktbildung und „metabolisches Schicksal“ Cytochrom P450-abhängiger Eicosanoide

Einmal gebildet, können EETs und 20-HETE direkt mit ihren primären Zielen interagieren (bisher unbekannte Rezeptoren oder andere Eicosanoid-bindende Proteine) und so an Signalkaskaden teilnehmen. Sie können aber auch auf unterschiedlichen Wegen gespeichert, umgewandelt oder abgebaut werden (Abbildung 1-7).

1. Sie können durch FABPs (Fettsäure bindende Proteine) selektiv gebunden und vor Abbau geschützt werden [55].
2. EETs und 20-HETE können CYP-abhängig zu Sekundärmetaboliten umgewandelt werden, die Hydroxy-EETs (HEETs). Diese sind hochaffine Liganden für  $\text{PPAR}\alpha$  (Peroxisom Proliferations-aktivierter Rezeptor) [56, 57].
3. Aus CYP-abhängig gebildeten Eicosanoiden können COX-abhängig Prostaglandin- und Thromboxan-Analoga gebildet werden [42, 58, 59]

4. EETs und 20-HETE können nach Bildung von Acyl-CoA Derivaten in Glycerophospholipide inkorporiert werden und so im Membranpool gespeichert werden [26, 27].
5. Sie können durch Kettenverlängerung oder partielle und vollständige  $\beta$ -Oxidation zu neuen biologisch aktiven Metaboliten umgewandelt werden [26, 27].
6. Die Epoxygruppe der EETs kann durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) hydrolysiert werden.



**Abbildung 1-7: „Metabolisches Schicksal“ von Eicosanoiden am Beispiel der EETs.**

EETs können auf unterschiedliche Weise weiter metabolisiert werden: (1) durch selektive Retention durch FABPs, (2) durch Bildung von Sekundärmetaboliten über CYP-abhängige Stoffwechselwege, (3) durch Bildung von Prostaglandin- und Thromboxan-Analoga über einen COX-abhängigen Stoffwechselweg, (4) durch Inkorporation in Glycerophospholipide nach Bildung von Acyl-CoA Derivaten, (5) Kettenverlängerung oder partielle und vollständige  $\beta$ -Oxidation und (6) durch Hydrolyse der Epoxygruppe durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH).

## 1.7 Struktur und kardiovaskuläre Funktion der löslichen Epoxidhydrolase

### 1.7.1 Enzymatische Eigenschaften

Das sEH Protein besteht aus zwei Domänen (Abbildung 1-8) [60, 61]. Die enzymatische Funktion der N-terminalen Domäne ist die einer Phosphatase. Sie dephosphoryliert Testsubstrate wie 4-Nitrophenyl-Phosphat [62] und verschiedene Lipid-Phosphate, z.B. Isoprenoid-Pyrophosphate wie Farnesyl (FPP)- und Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) und die korrespondierenden Monophosphate

[63]. Die N-terminale sEH Domäne könnte so mit der Prenylierung und Aktivierung von Signalkomponenten wie RAS und RhoA interferieren und darüber hinaus auch die Verfügbarkeit von Vorläufern für die Cholesterol-Biosynthese reduzieren.

Die C-terminale Domäne trägt die namens gebende Hydrolase Aktivität und wandelt EETs zu den korrespondierenden Diolen (DHETs) um. Diese Reaktion resultiert (1.) im Verlust einiger biologischer Aktivitäten der EETs [64] und (2.) in einer Verschiebung zwischen aktiven und inaktiven EET Enantiomeren aufgrund der Stereoselektivität der sEH [65, 66].

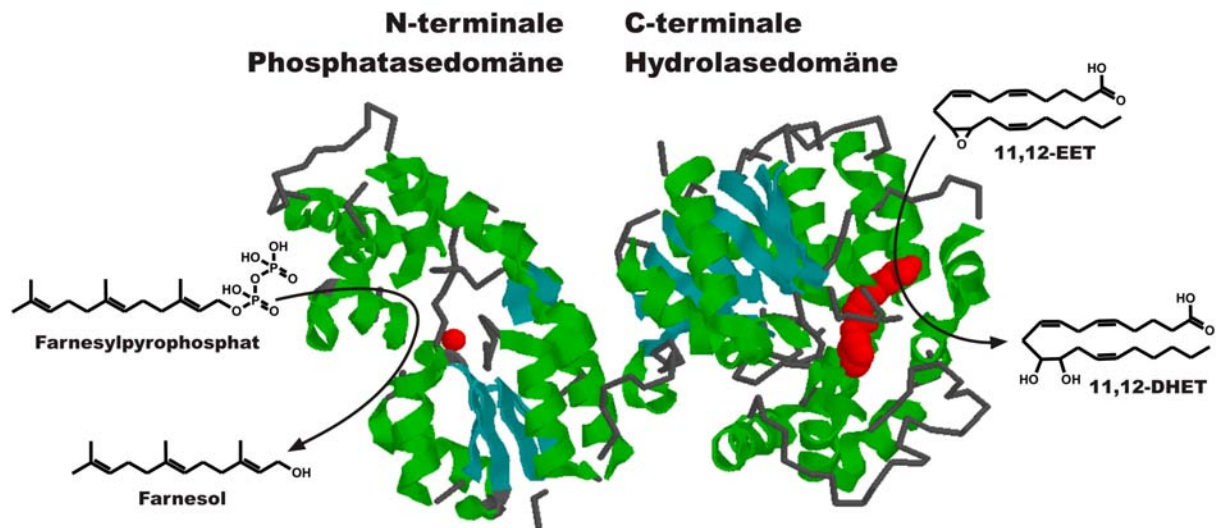
Die sEH kann im Zytosol oder in Peroxisomen lokalisiert sein [67]. Es ist möglich, dass die Lokalisierung der sEH ihre Funktion bestimmt, da im Zytosol vermutlich EET hydrolysiert werden und Peroxisomen der Ort der FPP und Cholesterol Biosynthese sind.

#### 1.7.2 Physiologische Rolle der löslichen Epoxidhydrolase

Die sEH Expression wird über AP-1 Aktivierung durch ANG II induziert. Dies ist eine wichtige Verbindung zwischen sEH und kardiovaskulären Erkrankungen [68].

In Tiermodellen mildert die pharmakologische Hemmung der sEH den durch ANG II Infusion verursachten Bluthochdruck, verhindert die Entwicklung TAC (thoracic aortic constriction)-induzierter Herzhypertrophie, reduziert die Infarktgröße bei ischämischem Schlaganfall und hat schmerzstillende Effekte [26, 64, 69, 70, 71, 72]. Da sEH Inhibitoren in der Vaskulatur teilweise selbst Vasodilatoren sind [73] und sie auch als PPAR $\alpha$  Aktivatoren wirken [74], ist nicht vollständig geklärt, ob die positiven Effekte der pharmakologischen Intervention nur auf der sEH Hemmung beruhen. Gezielte Genzerstörung der sEH in der knockout Maus zeigen jedoch auch positive Effekte, wie eine verbesserte Erholung der Herzfunktion nach I/R [75].

Die Bedeutung der sEH im kardiovaskulären System wird dadurch bestärkt, dass genetische Variationen im humanen EPHX2 Gen mit koronaren Herzerkrankungen assoziiert sind. Zudem scheinen bestimmte allele Varianten die Ansprechbarkeit auf und andere den Schutz vor ischämischem Schlaganfall zu erhöhen.



**Abbildung 1-8: Struktur und Funktion der löslichen Epoxidhydrolase (sEH).**

Das sEH Protein besteht aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne weist Phosphatase Aktivität auf und dephosphoryliert Isoprenoidphosphate und verwandte Strukturen. Die C-terminale Domäne hat die Funktion einer Hydrolase und hydrolysiert EETs und verwandte Strukturen. Kristallstrukturen der sEH sind unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure> zu finden.



## 1.8 Zielsetzung

20-HETE fungiert in der Niere als Mediator bei der Regulation des Blutflusses und der Salzausscheidung (vgl. 1.5). Daher sind die Mechanismen der Biosynthese und Wirkung von 20-HETE von großem Interesse für ein besseres Verständnis der Ursachen von Bluthochdruck und Nierenerkrankungen. Die Klärung dieser Fragestellung mit Hilfe von transgenen und knockout Modellen wurde bisher dadurch erschwert, dass die Identität der „20-HETE-Synthase“ in der Maus ungeklärt war. Vor diesem Hintergrund bestand das Hauptziel der vorliegenden Arbeit in der Identifizierung der 20-HETE bildenden CYP-Isoform in der Mausniere. Dazu sollten im Einzelnen folgende Teilaufgaben bearbeitet werden:

1. Auswahl von Kandidaten anhand einer computergestützten Analyse der Gene im Cyp4abx-Cluster der Maus im Vergleich zu Ratte und Mensch.
2. Klonierung und heterologe Expression rekombinanter Cyp4a/CPR-Systeme in Sf9-Insektenzellen.
3. Aufklärung der Substrat- und Wirkungsspezifität der Cyp4a-Isoformen bei der Umsetzung von LA, AA und EPA.
4. Analyse der geschlechts- und stammspezifischen Expression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere.
5. Testung von Inhibitoren zur Hemmung der 20-HETE Synthese.

Während der Bearbeitung dieses Themas ergaben sich in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen eine Reihe zusätzlicher Fragestellungen:

1. Ausgehend von dem Nebenfund, dass die identifizierte 20-HETE bildende Isoform EPA zu 17(R),18(S)-EETeTr als Hauptprodukt umsetzte, sollte geklärt werden, ob  $\omega$ -3 Epoxide Substrate der sEH sind und durch diese stereoselektiv hydrolysiert werden (Kooperation: B. Hammock, UC Davis, California).
2. In einem Rattenmodell des akuten Nierenversagens sollte analysiert werden, in welcher Weise die renale 20-HETE Bildung durch Uninephrektomie und I/R, sowie Behandlung mit einem CYP4A-Inhibitor beeinflusst wird (Kooperation: D. Dragun, Charité, Berlin).
3. In einem Rattenmodell zur Entwicklung der Herzinsuffizienz sollte untersucht werden, ob ein Polymorphismus im *EPHX2* Gen Auswirkungen auf die sEH Aktivität in Herzen und Nieren hat (Kooperation: N. Hübner, MDC, Berlin).

## **2 Material und Methoden**

Die verwendeten Chemikalien waren von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma. Abweichendes ist im jeweiligen Kapitel direkt aufgeführt. Die verwendeten Waagen waren von der Firma Kern, die Zentrifugen von der Firma Heraeus Sepatec. Alle weiteren Geräte sind im jeweiligen Abschnitt erwähnt.

Alle gentechnischen und molekularbiologischen Standardmethoden, wie Ligationen, Restriktionen, Agarose-Gel Elektrophoresen, Plasmidpräparationen und die Herstellung von Kultivierungsmedien für *E. coli*, wurden nach aktuellen Anleitungen der Cold Spring Harbor Protocols [<http://www.cshprotocols.org/>] durchgeführt.

### **2.1 Gentechnische Methoden**

Die Klonierung der verschiedenen Cyp4a Isoformen erfolgte in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kollegen (Cyp4a12a: Dr. Wolf-Hagen Schunck, Cyp4a12b: Dr. Maren Wellner, Cyp4a14: Mathias Gerhard).

#### **2.1.1 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Isolierung wurden max. 30 mg frisches Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Das Gewebe wurde im Lysispuffer RLT mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und Qias shredder (Qiagen) aufgeschlossen. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen) nach dem „Protokoll Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe“ gewonnen. Chromosomale DNA wurde während der RNA Isolierung durch DNase Verdau (RNase-Free DNase Set, Qiagen) entfernt. Die Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte bei -80 °C.

Zur Isolierung präglomerulärer Mikrogefäße wurden die Nieren an der corticopapillaren Achse halbiert. Die Arteriolen wurden unter einem Präparationsmikroskop mit Mikroschere und Pinzette vom umgebenden Gewebe befreit. Die Gesamt-RNA wurde wie oben beschrieben isoliert.

## 2.1.2 TaqMan-RT-PCR

TaqMan-RT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Maren Wellner mit dem qPCR Mastermix (Applied Biosystems) und dem Sequence detector 7700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Jede Messung erfolgte dreifach, die Expressionshöhe wurde auf die Expression der Glycerinaldehyde-3-phosphat Dehydrogenase normalisiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

**Tabelle 2-1: TaqMan-RT-PCR Primer für Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b und Cyp4a14.**

Isoform	Primer	Sequenz (5'-3')
Cyp4a10	vorwärts	TCT CTG CTC TAA GCC CAA CC
	rückwärts	CGA GCA CAG AGG CCA CTT G
	Sonde	6-Fam TTT GCA GAC AGC CTC TCT GGC TTC CT-Tamra
Cyp4a12a,	vorwärts	GCC TTA TAC GGA AAT CAT GGC A
	rückwärts	TGG AAT CCT GGC CAA CAA TC
	Sonde	6-Fam ACT CTG TTC GTG TAA TGC TGG ATA AAT GGG AA-Tamra
Cyp4a12b	vorwärts	CCT TAT ACG GAA ATC ATG GCA GA
	rückwärts	TGG AAT CCT GGC CAA CAA TC
	Sonde	6-Fam TCT GTT CAT GTC ATG CTG GAT AAA TGG GAA-Tamra
Cyp4a14	vorwärts	GAC CCT CCA GCA TTT CCC A
	rückwärts	TCC TTG TCC TTC AGA TGG TGC
	Sonde	6-Fam CAT GCC TTC CCA CTG GCT TTG GG-Tamra

Primer und Sonde für Cyp4a12a amplifizierten und detektierten auch Cyp4a12b, Primer und Sonden für Cyp4a12b erkannten Cyp4a12a jedoch nicht. Da Cyp4a12b mRNA in der Niere nur in äußerst geringen Mengen vorhanden ist (vgl. Abschnitt 3.2.1 in Ergebnisse), konnte der Einfluss von Cyp4a12b auf die Expressionshöhe von Cyp4a12a vernachlässigt werden.

## 2.1.3 Cyp4a cDNA Generierung mittels RT-PCR

Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA aus den Nieren männlicher NMRI Mäuse, bzw. im Fall von Cyp4a12b Gesamt-RNA aus der Leber einer männlichen C57BL/6 Maus verwendet. Die RT-PCR wurde mit dem Ready-To-Go RT-PCR Kit (Amersham Pharmacia Biotech) mit 300 ng Gesamt- RNA durchgeführt. Für die reverse Transkription wurden Oligo-dT Primer (Invitrogen) verwendet und für die PCR Amplifikation Isoform-spezifische Primer (Biotez). Die Isoform-spezifischen Primer enthalten zur Vereinfachung der Klonierung z.T. eine Restriktionsschnittstelle und

sind in Tabelle 2-2 aufgelistet. Die Annealing-Temperatur der Isoform-spezifischen Primer wurde mit folgender Formel berechnet, wobei GC der prozentuale Anteil der Guanine und Cytosine und L die Länge des Primers sind:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41\text{GC} - 650/L - 5.$$

Für die Amplifikation von Cyp4a12a und Cyp4a12b konnte aufgrund der hohen Homologie nur ein Primerpaar verwendet werden. Zur Klonierung von Cyp4a12b wurde ein Verdau des RT-PCR Produktes mit *AvrII* vorgenommen. *AvrII* schneidet spezifisch Cyp4a12a, so dass nach Restriktion, Agarose-Gelelektrophorese und Agarose-Gelaufreinigung (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech) ausschließlich die Cyp4a12b cDNA vorlag. Die erwartete Größe der RT-PCR Produkte war ca. 1.600 bp.

**Tabelle 2-2: Primer für die Klonierung der Cyp4a-Isoformen der Maus.**

Isoform	Primer	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle
Cyp4a10	vorwärts	TCG GAA TTC GCA ATG AGT GTC TCT GCT CTAA	Eco RI (5')
	rückwärts	CCG CTC GAG CGG TCA GTG GTG GTG GTG GTG GAG	Xho I (3')
		CTT CTT GAG ATG TAG	
Cyp4a12a,	vorwärts	ACG CGT AAG CTG TTG TAT CAT GAG TGC	Mlu I (5')
Cyp4a12b	rückwärts	GCT AGC CAT TTG AGC TGT CTT GTT CTG	Nhe I (3')
Cyp4a14	vorwärts	CGA CTC GAT CCA GAA ACT AC	-
	rückwärts	ACA GGA CAC ATT GCA GAG AG	-

#### 2.1.4 Klonierung der Cyp4a-Isoformen

Die PCR Produkte wurden mit dem TOPO-TA-Cloning Kit (Invitrogen) in den Vektor pCR2.1 (Abbildung 2-1) kloniert und in TOP10 chemisch kompetente *E. coli* transformiert. Von den entstandenen Klonen wurden mindestens drei verschiedene sequenziert (Invitek GmbH, Berlin; Agowa GmbH, Berlin).

Zur Expression der Cyp4a Isoformen in *Sf9*-Insektenzellen wurden die cDNAs in den pFastBac 1 Vektor (Bac-To-Bac System, GibcoBRL; Abbildung 2-1) umkloniert. Dazu wurden die jeweiligen Restriktionsschnittstellen, die bei der cDNA Gewinnung eingeführt wurden, verwendet. Für die Umklonierung wurden Cyp4a10 und pFastBac 1 mit *EcoRI* und *XhoI* geschnitten, über Agarose-Gelelektrophorese isoliert und die DNA aus dem Agarose-Gel extrahiert (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech). Die Fragmente wurden anschließend durch Ligation miteinander verbunden und in Top10 chemisch kompetente *E. coli* transformiert. Mit

den anderen Isoformen wurde ebenso verfahren. Für die Klonierung von Cyp4a12a und Cyp4a12b wurden diese mit *Mlu*I und *Nhe*I und pFastBac 1 mit *Rsr*II und *Spe*I geschnitten. Dabei entstanden kompatible Schnittstellen, die durch Ligation verbunden werden konnten, dabei jedoch verloren gingen. Cyp4a14 wurde mit *EcoRV* aus der Multiple Cloning Site des pCR2.1 Vektors umklontiert.

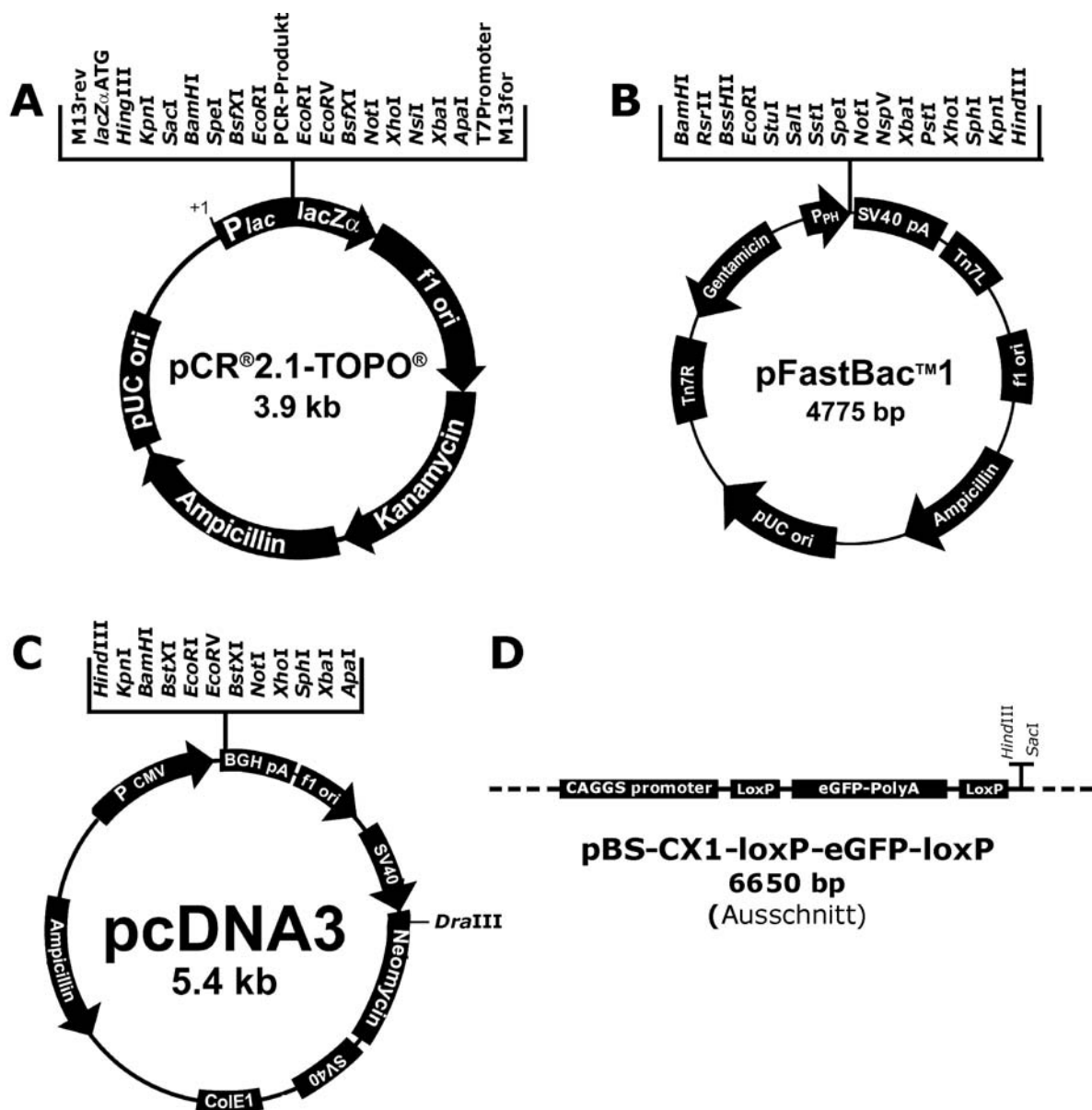


Abbildung 2-1: Klonierungsvektoren pCR2.1, pFastBac1, pcDNA3 und pBS-CX1-loxP-eGFP-loxP.

Die Transposition der Cyp4a cDNA von pFastBac in das Bacmid bMON14272 erfolgte durch Transformation des jeweiligen rekombinanten Cyp4a/pFastBac 1 Plasmides in DH10Bac *E. coli*. Dabei wurde nach dem Handbuch des BacToBac Expressionssystems (Invitrogen) vorgegangen.

#### 2.1.5 Klonierung von Cyp4a12a in den Vektor pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP

Zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Maus mit einer Überexpression von Cyp4a12a wurde die cDNA von Cyp4a12a zuerst in den Vektor pcDNA3 (Abbildung 2-1) kloniert, dort modifiziert und anschließend in den Vektor pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP (Abbildung 2-1) kloniert. Dieser Vektor wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Bader (MDC) zur Verfügung gestellt.

Cyp4a12a/pCR2.1 und pcDNA3 wurden mit *KpnI* und *NotI* verdaut und die Cyp4a12a cDNA mit dem geöffneten pcDNA3 ligiert. Nach chemischer Transformation von Top10 *E. coli* mit dem Ligationsprodukt, Anzucht transformierter Zellen auf Selektionsplatten und Vermehrung der Zellen in Flüssigmedium, folgte eine Plasmidpräparation, (diese Schritte erfolgten nach jeder Ligation und werden im Folgenden nicht nochmals erwähnt). Um die Cyp4a12a cDNA in den Vektor pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP klonieren zu können, wurde in Cyp4a12a/pcDNA3 und pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP mit Hilfe von Adaptern (vgl. Tabelle 2-3) eine neue Schnittstelle, *Ascl*, eingefügt. In pcDNA3/pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP wurde *Ascl* mit Hilfe der Schnittstelle *SacI* und in Cyp4a12a/ mit *DraIII* realisiert. Mit Hilfe der neuen Schnittstelle *Ascl* und *HindIII* konnte Cyp4a12a/Adapter-1/pcDNA3 in den Vektor pBS-CX1-loxP-EGFP-loxP/Adapter-2 kloniert werden. Der Vektor wurde an Natascha Alelina (AG Bader, MDC) zur Herstellung transgener Cyp4a12a Mäuse übergeben (vgl. Abschnitt 2.8.3).

**Tabelle 2-3: Adapter zur Umklonierung von Cyp4a12a.**

Adapter-1	CAAGGCGCGCCAAGAGCT TCGAGTTCCGCGCGGTTC	Schnittstellen: <i>SacI</i> – <i>Ascl</i> – <i>SacI</i>
Adapter-2	GTGGCCGCGCCACGTA CATCACCGCGCGGGTG	Schnittstellen: <i>DraIII</i> – <i>Ascl</i> – <i>DraIII</i>

### 2.1.6 Genotypisierung von Cre/loxP Cyp4a12a Mäusen

Zur Genotypisierung der Cyp4a12a/loxP- und SM22α/Cre-Mäuse (vgl. 2.8) wurde zuerst aus Mausschwanzbiopsien genomische DNA isoliert. Dazu wurden die Mausschwanzstücke in 100 µl Puffer (100 mM Tris, pH 8,5, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS) mit Proteinkinase K (1 mg/ml) bei 55 °C ÜN inkubiert. Die Proteinkinase K wurde für 5 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Nach Zugabe von 750 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) mit RNase A (20 µg/ml) zu den Proben wurden diese für die anschließende PCR verwendet.

Für die PCR wurden der Mastermix von Peqlab und die in Tabelle 2-4: Primer zur Genotypisierung. Tabelle 2-4 aufgeführten Primer verwendet. Das Temperaturregime folgte folgendem Ablauf: 95 °C (5 Minuten); 38 Zyklen 95 °C (30 Sekunden), die in Tabelle 2-4 angegebene Temperatur (30 Sekunden) und 72 °C (45 Sekunden), 72 °C (5 Minuten). Die PCR-Fragmente der Schwanzbiopsien transgener Mäuse sollten folgende Größen haben: 340 bp (Cre) und 511 bp (loxP).

**Tabelle 2-4: Primer zur Genotypisierung.**

Sequenziertes Element	Primer	Sequenz (5'-3')	Temperatur
loxP	vorwärts	GCC CCC TGC TGT CCA TTC CTT A	63 °C
	rückwärts	GGT GGG GAT GGG AAC TGC TGA G	
Cre	vorwärts	CTA GAG CCT GTT TTG CAC GTT C	58 °C
	rückwärts	GTT CGC AAG AAC CTG ATG GAC A	

## 2.2 Mikro- und zellbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 2-5 aufgelistet.

**Tabelle 2-5: Verwendete Mikroorganismen.**

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 recA1 araD139 galU galK</i> ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Stamm zur Amplifikation von Plasmiden (Invitrogen)
<i>E. coli</i> DH10Bac	F- <i>mcrA</i> ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> .M15 <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> . ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697 <i>galU galK</i> $\phi$ - <i>rpsL nupG</i> /pMON14272 / pMON7124	Stamm zur Transposition der Ziel-Gene in das Bacmid bMON14272 und zur Amplifikation des Bacmides (Invitrogen)
Sf9 Zellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zelllinie abgeleitet von IPLB-Sf-21-AE	Invitrogen

### 2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurden in LB-Medium oder auf LB-Platten kultiviert. Plattenkulturen wurden bei 37 °C bebrütet. Für Flüssigkulturen wurden einzelne Kolonien von einer Platte in 2 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Eine Selektion erfolgte über die Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin (TOP10), bzw. 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Genatmycin, 10 µg/ml Tetracyclin (DH10Bac). Blue-White Screening erfolgte über die Zugabe von 100 µg/ml X-gal und 40 µg/ml IPTG.

### 2.2.2 Kultivierung von *Sf9*-Zellen

*Sf9*-Insektenzellen wurden in Ex-Cell™ 401 (JRH Bioscience) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Gibco), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Für die Stammhaltung wurden in 100 ml Medium  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in einem 500 ml Erlenmeyerkolben bei 27 °C und 120 rpm inkubiert. Bei logarithmischem Wachstum mit einer Generationszeit von 18 bis 24 Stunden lag die Zellkonzentration nach 48 Stunden bei ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Lebensfähigkeit wurde durch Färbung der Zellen (> 95 % = log-Phase) mit 0,4 % Trypanblaulösung (Gibco) ermittelt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen passagiert, d.h. ihre Zellzahl mit frischem Medium auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in 100 ml reduziert.

Die Vermehrung von Baculoviren, die Virentiterbestimmung, sowie Einzel- und Koexpressionen wurden mit Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase und einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml durchgeführt.

### 2.2.3 Herstellung rekombinanter Cyp4a/Baculoviren

Die rekombinanten Cyp4a/Baculoviren wurden durch Transfektion von *Sf9*-Zellen mit den rekombinanten Cyp4a/Bacmiden (vgl. Abschnitt 2.1.4) nach dem Handbuch des BacToBac Expressionssystems (Invitrogen) hergestellt. Die gewonnenen rekombinanten Cyp4a/Primärviren wurden in *Sf9*-Zellen vermehrt (500 µl Primärvirus auf eine 50 ml Zellkultur mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml, Inkubation bei 27 °C und 120 rpm für 48 Stunden), der entstandene Cyp4a/Baculovirus geerntet und bei 4 °C abgedunkelt gelagert (vgl. BacToBac Expressionssystem, Invitrogen).



#### 2.2.4 Bestimmung des Titers der rekombinanten Cyp4a/Baculoviren

Der Virustiter wurde anhand der Infektion von *Sf9*-Zellen mit einem seriell verdünnten rekombinanten Cyp4/Baculovirus bestimmt. Dazu wurden in einer 12-Well-Schale  $5 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Nach Absetzen der Zellen (ca. 1 Stunde) wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem 1 ml frisches Medium zugesetzt wurde. Jedes Well wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen des rekombinanten Cyp4a/Baculovirus infiziert. Nach 72 Stunden Inkubation bei 27 °C erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der *Sf9*-Zellen: Die sichtbaren Kriterien einer Infektion waren Zellvergrößerung und Abnahme der Zelldichte. Die Menge an Virus in µl, die dem Well mit 100 %igen Infektion zugegeben wurde, diente dann zur Berechnung der Virustiter (pfu/ml). Beispiel: dem Well wurden 5 µl Baculovirus hinzugegeben, was zu einer vollständigen Infektion der *Sf9*-Zellen führte. Dann beträgt der Virentiter:

$$5 \times 10^5 \text{ Zellen} / 0,005 \text{ ml Inokulum} = 1 \times 10^8 \text{ pfu/ml.}$$

Der Virustiter der Cyp4a/Baculoviren lag bei  $2 \times 10^9$  pfu/ml, der Baculovirus der humanen CYP Reduktase (hCPR) hatte einen Virustiter von  $1 \times 10^9$  pfu/ml. Das Inokulum an Cyp4a/Baculovirus, mit dem eine *Sf9*-Insektenzellkultur für eine heterologe Expression infiziert wird, errechnet sich über die absolute Zellzahl, die „multiplicity of infection“ (MOI) und den Virustiter.

$$\text{Inokulum [ml]} = \text{MOI [pfu]} \times \text{absolute Zellzahl} / \text{Virustiter [pfu/ml]}$$

#### 2.2.5 Heterologe Expression der Cyp4a-Isoformen in *Sf9*-Zellen

Die heterologe Expression der Cyp4a-Isoformen wurde in 100 ml Kulturvolumen mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml durchgeführt.

Einzelexpression der Cyp4a-Isoformen: Die Expression der Cyp4a-Isoformen wurde durch Variation der MOI optimiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Einzelexpressionen zum Nachweis der Cyp4a-Isoformen im Westernblot wurden durch Infektion einer 100 ml *Sf9*-Zellkultur ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) mit folgenden MOIs/Inokula gewonnen: 5/500 µl (Cyp4a10), 5/500 µl (Cyp4a12a), 3/300 µl (Cyp4a12b) und 6,5/650 µl (Cyp4a14).

Die Koexpressionen einer Cyp4a-Isoformen mit der humanen CYP Reduktase (hCPR) wurden ebenfalls optimiert, indem verschiedene MOIs kombiniert wurden. Eine Expression im Verhältnis 1:1 wurde durch folgende MOIs erreicht: 5/3,5 (Cyp4a10/hCPR), 5/1  $\mu$ l (Cyp4a12a/hCPR), 3/1,5 (Cyp4a12b/hCPR) und 6,5/1 (Cyp4a14/hCPR).

Nach 24 Stunden wurde der 100 ml Kultur bei Einzelexpressionen 10  $\mu$ l Häminchlorid (50 mM in DMSO) und bei Koexpressionen 10 $\mu$ l Häminchlorid, 60  $\mu$ l 2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon (100 mM in Ethanol) und 1 ml Riboflavin (10 mM in H<sub>2</sub>O) zugesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 48 bis 72 Stunden durch Zentrifugation (500 x g, 10 Minuten). Die Zellen wurden 1 x PBS gewaschen und anschließend in Mikrosomenpuffer (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, pH 7,4) aufgenommen.

## **2.3 Präparative Methoden**

### **2.3.1 Präparation von Mikrosomen und zytosolischen Fraktionen**

Tiefgefrorene Organproben wurden mit einem Cryo-Pulverizer (Biospec Products Inc.) zerkleinert. Vor dem Zerkleinern wurde der Cryo-Pulverizer in flüssigem Stickstoff gekühlt, die Probe anschließend in den Mörser überführt und mit dem Stempel zerkleinert (2-3 Schläge mit dem Hammer auf den Stempel). Die Proben wurden zügig weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

Mikrosomen aus Sf9-Zellen: Aus den Zellpellets der heterologen Expressionen der Cyp4a-Isoformen in Sf9-Zellen, die in Abschnitt 2.2.5 beschrieben ist, wurden Mikrosomen präpariert. Der Mikrosomenpuffer wurde mit 1  $\mu$ l/ml PMSF (100 mM in Isopropanol) und 1  $\mu$ l/ml DTT (1 M in H<sub>2</sub>O) versetzt und die Zellen mittels 3 Ultraschallstößen von 20 Sekunden Länge (Braunsonic, B. Braun Melsung) aufgeschlossen. Die mikrosomale Fraktion wurde mittels differentieller Sedimentation gewonnen (10 Minuten bei 1.000 x g, 10 Minuten bei 10.000 x g, 65 Minuten bei 100.000 x g [Du Pont, TFT70.13]). Das erhaltene Mikrosomenpellet wurde mit einem Glashomogenisator in Mikrosomenpuffer ohne Zusätze homogenisiert und Aliquots in flüssigem Stickstoff schock gefroren.

Mikrosomen aus Mausnieren: Nierenmikrosomen wurden aus einer halben Niere/pro Tier präpariert. Die Kapsel und das Fettgewebe wurden vorsichtig entfernt und die

Niere geteilt. Die Nieren wurde in eiskaltem Tris/HCl-Puffer (pH 7,4, mit 0,25 M Saccharose, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1  $\mu$ M FAD/FMN, 0,25 mM PMSF) mit einem Teflon-Glas Homogenisator (Elvehjem) homogenisiert. Die mikrosomale Fraktion wurde mittels differentieller Zentrifugation gewonnen (10 Minuten bei 1.000 x g, 20 Minuten bei 10.000 x g, 90 Minuten bei 100.000 x g [Du Pont, TFT70.13]). Das 100.000 x g Pellet wurde mit einem Glashomogenisator in Tris/HCl-Puffer (pH 7,7 mit 20 % Glycerol, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) homogenisiert und Aliquots in flüssigem Stickstoff schock gefroren.

Die Mikrosomenpräparationen fanden unter ständiger Kühlung bei 4 °C oder auf Eis statt. Die Messung der CYP-, der Proteinkonzentration sowie der CPR-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Die Lagerung der Mikrosomen erfolgte bei -80 °C.

Zytosolische Fraktionen: Für die Bestimmung der Hydrolaseaktivität (Abschnitt 2.6.3) wurden die 100.000 x g (Nieren) bzw. die 10.000 x g (Herz) Überstände aus der differentiellen Zentrifugation verwendet. Die Organpräparationen erfolgten wie für Mikrosomen aus Mausnieren beschrieben.

Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry bestimmt (Abschnitt 2.4.3) und die Überstände bei -80 °C gelagert.

### 2.3.2 Präparationen für Proteinanalytik mit Westernblot

Für die Proteinanalytik wurden Organproben in Ripa-Puffer (10 mg/100  $\mu$ l; Ripa: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 1 x Complete [Protease Inhibitor Cocktail, Boehringer Mannheim]) aufgenommen. Die Proben wurden mit einem Homogenisatorstempel im Eppendorfgefäß homogenisiert. Der Überstand (Zentrifugation 10 Minuten bei 15.000 x g) wurde zur weiteren Herstellung von Westernblotproben und zur Proteinbestimmung nach Lowry (2.4.3) verwendet. Zur Präparation für die Westernblot Analytik wurden die Proben zuerst auf 10 mg Protein/ml mit NaOH (0,05 N) verdünnt und anschließend in einem Verhältnis von 1:2:1 mit Sammelgelpuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS) und 4xRotiload versetzt.

Aorta-Proben wurden in 120  $\mu$ l Ripa-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Zu den 120  $\mu$ l Ripa-Puffer

wurden 880 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl 72 %ige Tricarbonicessigsäure hinzugeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand nach Zentrifugation (10 Minuten, 15.000 x g) entfernt. Das Pellet wurde mit 1 ml Aceton gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (10 Minuten, 15.000 x g) entfernt. Für Westernblot Analytik wurde die Probe in 10 µl NaOH (0,05 N), 20 µl Sammelgelpuffer und 10 µl 4 x Rotiload (Roth) aufgenommen.

Alle Westernblot Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, 1 Minute bei 15.000 x g zentrifugiert und der Überstand auf das SDS-Gel aufgetragen.

### 2.3.3 Organpräparation für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Frisch entnommene Herzen wurden mit isotonischer Kochsalzlösung gespült, die Spitze des Herzens wurde glatt abgeschnitten und das Herz in flüssigem Stickstoff schock gefroren. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden bei -20 °C 5 µm dicke Kryoschnitte, angefangen bei der glatt abgeschnittenen Spitze, angefertigt, auf einen Objektträger übertragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Eine Fixierung der Schnitte erfolgt mit -20 °C kaltem Aceton (10 Minuten) und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur. Die Immunfärbung der Schnitte ist in Abschnitt 2.5.4 beschrieben.

### 2.3.4 Organpräparationen für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen muss das Organ in seiner Struktur fixiert werden. Dazu wurden die Mäuse mit Ether getötet, der Thorax geöffnet, mit einer Kanüle in die linke Herzkammer gestochen und der rechte Vorhof des Herzens angeschnitten. Das Tier wurde mit 20 ml PBS (1 x PBS mit 40 Einheiten Heparin) und anschließend mit dem Fixierer (s.u.) langsam perfundiert. Das Herz wurde entnommen und in Fixierer in schmale Ringe geschnitten.

Der Fixierer muss am selben Tag wie folgt hergestellt werden: 8 % Paraformaldehyd werden in 70 °C warmen bidest. H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Abkühlung wurde mit NaOH ein pH Wert von 7,4 eingestellt, die Lösung filtriert und 1:1 mit 0,2 M Phosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gemischt.

Eine weitere Fixierung der Herzschnitte mit Glutaraldehyd, das Anfertigen von Ultradünnschnitten und die Immunfärbung wurden von Dr. Bettina Erdmann (MDC) durchgeführt.

## **2.4 Spektralphotometrische Untersuchungen**

### **2.4.1 Bestimmung der Cytochrom P450-Konzentration**

CYPs absorbieren nach Reduktion und CO-Begasung bei einer Wellenlänge von 450 nm. Sie haben einen molaren Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [6]. Über das Lambert-Beersche-Gesetz

$$E = \epsilon(\lambda) \times d \times c$$

mit der Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$ , ergibt sich unter Berücksichtigung der Verdünnung mit der Extinktion bei 450 nm die Konzentration  $c$ .

40  $\mu\text{l}$  Mikrosomen (vgl. Abschnitt 2.3.1) wurden mit 800  $\mu\text{l}$  CYP-Messpuffer (0,1 M  $\text{K}_2\text{H}/\text{KH}_2\text{-PO}_4$ -Puffer, pH 7.4, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,3 % Emulgen 911, 0,1 % Natriumcholat) gemischt und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert. Das Referenzspektrum wurde bestimmt, die Probe anschließend mit CO begast und in einer weiteren Messung das Differenzspektrum bestimmt. Nach Abzug des Referenzspektrums vom Differenzspektrum ergab sich die CYP Konzentration über die Extinktion bei 450 nm.

### **2.4.2 Bestimmung der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität**

Die CPR-Aktivität wurde mit Hilfe von Cytochrom C (Cyt C) als artifiziellem Elektronenakzeptor bestimmt. Diese wurde durch Messung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 550 nm innerhalb von einer Minute bestimmt. Über das Lambert-Beersche-Gesetz, siehe Abschnitt 2.4.1, ergibt sich unter Berücksichtigung der Verdünnung über die Extinktionsänderung nach einer Minute bei 550 nm die Aktivität in U/ml. Der molare Extinktionskoeffizient von Cyt C ist  $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , die Schichtdicke ist  $d = 1 \text{ cm}$ . 1 U entspricht 1  $\mu\text{mol}$  reduziertes Cyt C/min. Für Berechnungen der CPR Konzentration wurde angenommen, dass 4,5 U mit 1nmol

CPR korrespondieren. Diese Annahme basiert auf der spezifischen Aktivität der gereinigten 79 kDa großen CPR von 60 U/mg.

Dazu wurden 5 µl Mikrosomen mit 100 µl Messpuffer (50mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) unter der Zugabe von 1 µl FAD/FMN-Stammlösung (1 mM in H<sub>2</sub>O) vorverdünnt. Der Messansatz enthielt 1 ml Messpuffer (22 °C), 0,25 ml Cytochrome C-Stammlösung (0,3 mM in Messpuffer), 0,1 ml KCN-Stammlösung (50 mM in Messpuffer) und 0,05 ml der vorverdünnten Probe. Die Reaktion wurde mit 0,1 ml NADPH-Stammlösung (1,5 mM in Messpuffer) gestartet.

### 2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry [76] anhand einer Absorptionsmessung bei 745 nm und sollte zwischen 0,15 und 0,2 Extinktionseinheiten liegen. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert (0,1 N NaOH). Mit einer Eichkurve von 10 – 100 µg BSA kann unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Schichtdicke  $d = 1$  cm die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Bei jeder Messung wurden Doppelwerte für die Proben, den Proteinstandard (50 µg/ml BSA) und den Leerwert (0,1 N NaOH) erstellt. Die Proben wurden 1:200 mit 0,1 N NaOH vorverdünnt. Anschließend wurde ein Messansatz aus der 0,2 ml vorverdünnten Probe und 1 ml Messpuffer hergestellt. 1 ml Messpuffer besteht aus 0,98 ml 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 N NaOH, 0,01 ml 0,5 % CuSO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O und 0,01 ml 2 % K-Na-Tartrat. Nach gründlichem Vortexen und 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde dem Ansatz 0,1 ml 50 % Folinreagenz (1:1 verdünnt mit H<sub>2</sub>O) zugesetzt. Nach gründlichem Vortexen und 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte aus den Messungen bei 745 nm der Mittelwert gebildet und mit linearen Teil der Eichkurve nun die Proteinkonzentration bestimmt werden.

## 2.5 Proteinanalytik

### 2.5.1 Herstellung eines Cyp4a12 Peptid-spezifischen Antikörpers

Um die verschiedenen Cyp4a-Isoformen auch auf Proteinebene voneinander unterscheiden zu können, wurde in dieser Arbeit ein peptid-spezifischer Antikörper

gegen Cyp4a12a entwickelt. Dazu wurde der Bereich von S266 bis R286 im Cyp4a12a Protein ausgewählt. Dieser Bereich befindet sich zwischen dem G und dem H loop, die beide von der Membran des endoplasmatischen Retikulums in das Zytosol hineinragen. Zudem sind die Aminosäuren in diesem Sequenzbereich hydrophil, so dass sich dieser Bereich des Proteins für eine Antikörperbindung eignet.

Von der Firma BIOSYNTHAN GmbH wurde ein Peptid synthetisiert, das in seiner Sequenz zu 100 % mit der Sequenz von Cyp4a12a 266 – 286 AS übereinstimmte: NH<sub>3</sub>-SRRIQLQDEEELEKLKKRR-COOH. Dieses Peptid wurde zur Antikörperbildung durch Immunisierung von Kaninchen verwendet (BioGenes - Gesellschaft für Polymere mbH). Die Antiseren der Kaninchen wurden gereinigt (BioGenes) und als Antikörper gegen Cyp4a12a eingesetzt.

### 2.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Trennung der Proben erfolgte nach Laemmli [77]. Dazu wurden 4-12 % Tris/Glycin Gele (Biozym/Cambrex) verwendet. Als Proben dienten die in Abschnitt 2.3.2 gewonnenen Poteinproben oder Mikrosomen (2.3.1), die mit RIPA-Puffer und 25 % Rotiload verdünnt und 5 Minuten bei 95 °C erhitzt wurden.

Für den Nachweis der heterolog in *Sf9*-Zellen exprimierten Cyp4a-Isoformen wurden 0,2 pmol CYP aufgetragen, für den Nachweis der Cyp4a-Isoformen in Nierenmikrosomen wurden 15 µg und für den Nachweis in Homogenaten verschiedener Organe 30 µg Protein aufgetragen. Als Standard diente SeeBlue (Invitrogen). Die Trennung erfolgte in einer Elektrophoreseapparatur (PEQLAB) mit Elektrodenpuffer (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei 35 Volt innerhalb einer Stunde.

### 2.5.3 Nachweis im Westernblot

Nach der Trennung im SDS-Gel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde zuerst das SDS mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) aus dem Gel ausgewaschen (10 Minuten). Anschließend wurden das Gel und die Nitrozellulosemembran zwischen in Transferpuffer

getränktem Filterpapier im Sandwich-Verfahren in eine Proteintransferapparatur (Phase) gelegt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei einem konstanten Strom von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  innerhalb von 90 Minuten.

Nach dem Transfer der Proteine erfolgte ihr Nachweis in einer Immunreaktion. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran zuerst für 90 Minuten in Block-Lösung (5 % Magermilchpulver in Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) inkubiert. Die primäre Immunreaktion der Nitrozellulosemembran mit dem peptidspezifischen Cyp4a12 Antikörper (vgl. Abschnitt 2.5.1) bzw. einem CYP4A1 Antikörpern (Daichi) erfolgte in 1:7.500 Verdünnung in Blocklösung unter leichtem Schwenken bei 4 °C über Nacht. Nach viermaligem Waschen mit reichlich Waschpuffer (5 bis 10 Minuten) und einmaligem Blocken mit Blocklösung (10 Minuten) erfolgte die sekundäre Immunreaktion mit einem Antikörper gegen Kaninchen IgG (gegen den Cyp4a12 Antikörper, Sigma) bzw. Ziegen IgG (gegen den CYP4A1 Antikörper, Sigma) in 1:7.500 Verdünnung in Blocklösung unter leichtem Schwenken für 1 Stunde. Nach erneutem Waschen der Membran konnte die Detektion mit Lumi-Light (Roche) erfolgen. Die „high performance chemiluminescence“ ECL Hyperfilme (Amersham Biosciences) wurden zu diesem Zweck zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten belichtet.

#### 2.5.4 Immunreaktion an Organschnitten

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die fixierten Schnitte aus Abschnitt 2.3.3 zur Vorbereitung für die Immunreaktion zum Quellen 5 Minuten in TBS inkubiert. Die Schnitte wurden für 30 Minuten mit 10 % Eselserum (in TBS) geblockt und anschließend mit dem primären peptidspezifischen Antikörper gegen Cyp4a12 (1:500 in TBS verdünnt) 1 Stunde in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem 10-minütigem Waschen mit TBS (9 g/l NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) wurden die Schnitte mit dem sekundären Fluoreszenzantikörper Esel anti IgG Kaninchen, der an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt ist, inkubiert. Die Antikörpervedünnung war 1:500, die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Nach dreimaligem 10-minütigem Waschen mit TBS wurden die Schnitte in Vectashild-Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories) eingebettet. Die eingebetteten Schnitte wurden mit Deckgläsern abgedeckt und mit Lack luftdicht verschlossen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte abgedunkelt bei 4 °C. Die



Fluoreszenzmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Fatimunnisa Qadri (AG Müller, MDC) durchgeführt.

Die Immunreaktionen an den Schnitten für die Elektronenmikroskopie wurden von Dr. Bettina Erdmann durchgeführt. Dr. Erdmann verwendete eine Verdünnung von 1:800 der primären Antikörper gegen die sEH der Maus. Die polyklonalen Antikörper gegen die sEH der Maus wurden uns von Prof. Dr. Bruce Hammock (University of California, Davis) zur Verfügung gestellt.

## **2.6 Chemische Synthesen und enzymatische Aktivitätsassays**

Chemische Synthesen von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP, sowie die Aktivitätsbestimmungen der sEH aus Maus, Ratte und Mensch und die Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften der Cyp4a-Isoformen wurden mit folgenden radioaktiv markierten Substraten der Firma Hartmann (Ausnahme: LA, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt:

[1-<sup>14</sup>C]-LA: 53 mCi/mmol, 0,05 mCi/ml,

[1-<sup>14</sup>C]-AA: 55 mCi/mmol, 0,05 mCi/ml,

[1-<sup>14</sup>C]-EPA: 54 mCi/mmol, 0,1 mCi/ml,

[1-<sup>14</sup>C]-DHA: 52 mCi/mmol, 0,1 mCi/ml.

Nicht markierte Substrate, sowie Substrate zum Verschneiden der radioaktiv markierten Substrate waren von der Firma Cayman Chemicals. Alle Fettsäuren lagen gelöst in Ethanol vor, LA war in Hexan gelöst.

### **2.6.1 Epoxidsynthesen**

Die chemische Synthese der Epoxide erfolgte in Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) mit 3-Chlorperbenzoesäure (CPB) [78]. Dazu wurden 500 nmol Ausgangssubstanz (AA, EPA oder DHA; unmarkiert oder radioaktiv markiert) in ein Reaktionsröhrchen überführt, das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer (Büchi) eingeeengt und das Substrat in 2,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml CPB (1,15 mM in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) erfolgte eine Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl Methylensulfid und einer Inkubationszeit

von 20 Minuten im Dunkeln gestoppt.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde am Rotationsverdampfer eingengt, das epoxidierte Substrat in 200  $\mu\text{l}$  EtOH aufgenommen. Die Trennung der regioisomeren Epoxide voneinander erfolgte über RP-HPLC (wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben). 5,6-, 8,9- und 11,12-EET wurden zusätzlich über die NP-HPLC getrennt (wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben). Die Stereoisomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP wurden mit CP-HPLC getrennt (wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben).

#### 2.6.2 Assays zur Bestimmung von Fettsäure Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität

Der Standardansatz für die Bestimmung der Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität wurde in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  wie folgt durchgeführt: Das Substrat wurde mit einem Überschuss von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ausgesalzen, das Ethanol im Vakuumblock unter  $\text{N}_2$ -Begasung verdampft und die Salze der Fettsäuren im Inkubationspuffer (0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2) gelöst. Mikrosomen wurden in der erwünschten CYP-Konzentration hinzugegeben (Gesamtvolumen hier 90  $\mu\text{l}$ ). Der Ansatz wurde unter Schütteln (ca. 200 rpm) 5 Minuten vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  NADPH (10 mM in Inkubationspuffer) gestartet und nach definierter Inkubationszeit durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Zitronensäure (0,4 M in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gestoppt. Die Aufarbeitung von Substrat und Produkten erfolgte durch zweifache Extraktion mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat. Das Ethylacetat wurde im Vakuumblock unter  $\text{N}_2$ -Begasung verdampft und die Proben in 99,8 %igem Ethanol aufgenommen. Die eingesetzte Substratmenge, sowie die Ausbeute der Extraktion wurden durch Radioaktivitätsmessung eines Aliquots im Szintillationszähler (1900TR, Packard) kontrolliert. Die Analyse der Aktivitätsassays erfolgte mit RP-HPLC (Abschnitt 2.7).

Für die Aktivitätsbestimmungen mit Cyt b5 wurde die jeweilige Cyp4a-Isoform in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit Cyt b5 in 15  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Substrat wurde in 75  $\mu\text{l}$  raumtemperiertem Inkubationspuffer gelöst und für die Vorinkubation mit dem Cyp4a/Cyt b5 Gemisch vereinigt. Anschließend wurde nach dem Protokoll des Standardansatzes verfahren.

Die Bestimmung der Substratspezifität von Cyp4a12a und Cyp4a12b wurde mit 0,1  $\mu\text{M}$  CYP Enzym mit und ohne Cyt b5 durchgeführt. Die verwendeten Substratkonzentrationen waren 10  $\mu\text{M}$  AA bzw. EPA. Die Inkubationszeit betrug 10

(AA und EPA). Die Bestimmung der 20-COOH-AA Bildung wurde mit 0,1  $\mu$ M Cyp4a12a, 10  $\mu$ M 20-HETE und 10 Minuten Inkubationszeit durchgeführt.

Die Bestimmung der Substratspezifität von Cyp4a10 und Cyp4a14 für LA (30  $\mu$ M) wurde mit 0,1  $\mu$ M CYP-Enzym (bei Cyp4a10 mit und ohne Cyt b5) und einer Inkubationszeit von 5 Minuten durchgeführt. Bei 10  $\mu$ M AA und EPA-Ansätzen wurden 0,5  $\mu$ M Enzym (Cyp4a10 mit und ohne Cyt b5) 30 Minuten inkubiert.

Für eine genauere Analyse der aus AA und EPA durch Cyp4a12a oder Cyp4a12b gebildeten Metabolite wurden die Reaktionsansätze auf 1 ml vergrößert. Die regioisomere Zusammensetzung des 19-/20-HETE und des 19-/20-HEPE Peaks konnte über RP- und NP-HPLC ermittelt werden, die stereoisomere Zusammensetzung des 17,18-EETeTr Peaks ergab sich aus CP-HPLC (Abschnitt 2.7).

Die Km-Wert Bestimmungen wurden mit 0,1  $\mu$ M der jeweiligen Cyp4a- durchgeführt. Die verwendeten LA Konzentrationen waren 1,25, 2,5, 3,34, 5, 6,67, 10, 20  $\mu$ M, die Inkubationszeit betrug 1 Minute. Die verwendeten AA und EPA Konzentrationen - diese Versuche wurden nur mit Cyp4a12a und Cyp4a12b durchgeführt - waren 5, 6,25, 8,3, 12,5, 20, 30, 50  $\mu$ M, die Inkubationszeit betrug 3 Minuten. Die Km- und V<sub>max</sub>-Werte wurden für alle Cyp4a-Isoformen außer Cyp4a14 mit und ohne Cyt b5 bestimmt.

Für Inhibitionsstudien mit dem Hemmstoff HET0016 wurde eine Verdünnungsreihe von HET0016 (in DMSO) angelegt, so dass maximal 0,5  $\mu$ l der Inhibitor-DMSO Lösung zu einem 100  $\mu$ l Reaktionsansatz hinzugefügt wurden. Die getesteten Konzentrationen waren: 35, 200 und 1000 nM HET0016 im Gesamtansatz. Die Zugabe erfolgte direkt zum Substrat, vor der Zugabe der Mikrosomen. Die Versuche wurden mit 10  $\mu$ M Substrat (LA, AA), 0,1  $\mu$ M CYP und 3 (LA) bzw. 20 (AA) Minuten Inkubationszeit durchgeführt. Die Bedingungen für HET0016 Hemmversuche an Mausleber-, Mausnieren- und Rattennierenmikrosomen waren 20  $\mu$ M AA, 0,8  $\mu$ g/ $\mu$ l Protein und 30 Minuten Inkubationszeit. Inhibitionsversuche an humanen Lebermikrosomen wurden mit 10  $\mu$ M AA, 0,8  $\mu$ g/ $\mu$ l Protein und 20 Minuten Inkubationszeit durchgeführt.

Die AA-Hydroxylase- und AA-Epoxygenaseaktivität von Mausnierenmikrosomen wurde mit 40  $\mu\text{M}$  AA, 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein und einer Inkubationszeit von 20 Minuten bestimmt.

### 2.6.3 Assays zur Bestimmung der Hydrolaseaktivität

Der Standardansatz zur Bestimmung der Hydrolaseaktivität wurde in 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen durchgeführt. Das Ethanol, in dem das Substrat gelöst vorlag, wurde im Vakuumblock unter  $\text{N}_2$ -Begasung verdampft, die Fettsäure-Epoxide in Inkubationspuffer (0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2) gelöst und unter Schütteln (ca. 200 rpm) bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert (5 Minuten). Durch Zugabe der zytosolischen Fraktion oder der vorverdünnten gereinigten sEH zum Substrat wurde die Reaktion gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat gestoppt. Die Aufarbeitung von Substrat und Produkten erfolgte durch zweifache Extraktion mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat. Das Ethylacetat wurde im Vakuumblock unter  $\text{N}_2$ -Begasung verdampft und die Proben in 99,8 %igem Ethanol aufgenommen. Auch hier erfolgte eine Kontrolle der eingesetzten Substratmenge, sowie der Ausbeute der Extraktion durch Radioaktivitätsmessung eines Aliquots im Szintillationszähler (1900TR, Packard). Die Analyse der Aktivitätsassays erfolgte mit RP-HPLC (Abschnitt 2.7).

Untersuchungen zu stamm-, geschlechts- und gewebespezifischen Unterschieden in der Hydrolaseaktivität wurden an zytosolischen Fraktionen verschiedener Organe unterschiedlicher Spezies durchgeführt.

Die Hydrolaseaktivität der Mausnieren wurde mit 50  $\mu\text{M}$  14,15-EET, 5 ng Protein (zytosolische Fraktion, siehe Abschnitt 2.3.1) und einer Inkubationszeit von 10 Minuten ermittelt.

Für die Bestimmung der Hydrolaseaktivität der Rattennieren wurden 10  $\mu\text{M}$  14,15-EET mit 40 (WKY) bzw. 5 (SHHF)  $\mu\text{g}$  Protein in 1 Minute in einem Standardansatz umgesetzt.

Die Hydrolaseaktivität der Rattenherzen wurde im Standardansatz mit 10  $\mu\text{M}$  14,15-EET mit 15 ng Protein und einer Inkubationszeit von 1 Minute ermittelt.

Die Hemmung der Hydrolaseaktivität in Mausnieren mit ADU wurde im Standardansatz mit 10  $\mu\text{M}$  14,15-EET, 2  $\mu\text{g}$  Protein und einer Inkubationszeit von 4 Minuten durchgeführt. ADU wurde in DMSO gelöst, vor dem Reaktionsansatz zur zytosolischen Fraktion gegeben und 10 Minuten inkubiert (37 °C, 200 rpm).

Hemmversuche mit ADU an Mesenterialarterien wurden in 200  $\mu\text{l}$ , mit 20  $\mu\text{M}$  14,15-EET in 30 Minuten durchgeführt. ADU wurde in DMSO gelöst und mit den Mesenterialarterien im Inkubationspuffer inkubiert (10 Minuten, 37 °C, 200 rpm). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet.

Die gereinigte rekombinante sEH aus der Maus, der Ratte und dem Menschen wurde uns von Prof. Dr. Bruce Hammock (University of California, Davis) zur Verfügung gestellt. Die Proteinkonzentrationen der gereinigten Enzyme waren 12 mg/ml (sEH der Maus), 2 mg/ml (sEH der Ratte) und 3,3 mg/ml (sEH des Menschen). Die Hydrolaseaktivität der gereinigten sEH-Enzyme wurde in einem Standardansatz untersucht. Das Enzym wurde in Inkubationspuffer mit 0,5 mg/ml BSA (Fraktion V, Sigma) vorverdünnt, die BSA-Konzentration im Standardansatz lag letztendlich bei 0,1 mg/ml.

Die Aktivitätsbestimmungen für den Vergleich der racemischen Substrate 14,15-EET, 11,12-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP wurden mit einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ , einer Enzymkonzentration von 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und einer Inkubationszeit von 10 Minuten durchgeführt.

Für die Bestimmung der Abnahme eines Enantiomers aus einem racemischen Gemisch wurden 10  $\mu\text{M}$  14,15-EET und 11,12-EET in 250  $\mu\text{l}$  Volumen mit 0,15 ng/ $\mu\text{l}$  (14,15-EET) bzw. 0,4 ng/ $\mu\text{l}$  (11,12-EET) sEH der Maus umgesetzt. Dem Ansatz wurde bei 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten ein Aliquot von 50  $\mu\text{l}$  entnommen und die Reaktion mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat gestoppt. Ansonsten wurde das zu Beginn des Kapitels beschriebene Protokoll befolgt. Die Analyse der Proben erfolgte mit CP-HPLC (Abschnitt 2.7).

Die K<sub>m</sub>-Wert Bestimmung der Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP wurde mit den Substratkonzentrationen 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  für das R,S- und 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250  $\mu\text{M}$  für das S,R-Enantiomer durchgeführt. Die verwendeten Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 2-6 aufgeführt. Die Inkubationszeit betrug 1 Minute.

**Tabelle 2-6: Eingesetzte sEH Proteinkonzentrationen.**

	Proteinkonzentration in ng/μl		
	sEH der Maus	sEH der Ratte	sEH des Menschen
17(R),18(S)-EETeTr	0,10	0,10	0,33
17(S),18(R)-EETeTr	0,40	0,40	1,50
19(R),20(S)-EDP	0,11	0,07	0,33
19(S),20(R)-EDP	4,00	0,27	1,25

## 2.7 Chromatographische Methoden

Die Analyse von Substraten und Produkten erfolgte mit „Reverse phase“ (RP) „high performance liquid chromatography“ (HPLC). Bei unzureichender Auflösung wurden weitere HPLC Schritte durchgeführt. So wurden 19- und 20-HETE, 19- und 20-HEPE, sowie 5,6-, 8,9- und 11,12-EET mit Normal Phasen (NP-) HPLC getrennt. Enantiomere von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EET wurden mit Chiral Phasen (CP-) HPLC aufgelöst.

Die HPLC Anlage (Shimadzu) bestand aus dem Systemkontroller SCL-10A, zwei LC-10AD Pumpen, dem gekühlten automatischen Probengeber SIL-10AD, dem Säulenofen CTO-10AS und dem UV-Detektor SPD-M10A. Radioaktivität wurde mit dem Radioflow Detektor LB509 (EG&G Berthold) gemessen. Die verwendeten Säulen sind im jeweiligen Abschnitt aufgeführt.

Für quantitative Analysen wurden ca. 150.000 DPM auf die HPLC aufgetragen und durch Integration der Peakflächen mit der PC-Software ClassVP 5.03 (Shimadzu) die prozentualen Anteile von Substrat und Produkten bestimmt. Die Enzymkinetik wurde mit dem „Enzyme Kinetics Modul“ der Software SigmaPlot 7 (SPSS) erstellt.

Referenzsubstanzen wurden, soweit nicht käuflich erwerbbar (Cayman Chemicals), im Labor von Dr. W.-H. Schunck von Dr. H. Honeck synthetisiert [78, 79] und ihre Identität mittels GC/MS nachgewiesen.

### 2.7.1 Revers Phasen HPLC

Für die RP-HPLC wurden die Aktivitätsassays und Epoxidsynthesen (Abschnitt 2.6) in Ethanol gelöst. Aus LA und ihren Produkten wurden zuvor Methylester hergestellt, um eine vollständige Trennung der Produkte zu erreichen. Dazu wurden die Proben so lange mit ätherischer Diazomethanolösung, hergestellt nach deBoer [80], versetzt,

bis eine Gelbfärbung erzielt wurde. Das Ethanol-Diazomethan Gemisch wurde in einer Vakuumkammer unter N<sub>2</sub>-Begasung eingeeengt und die Proben in Ethanol aufgenommen. Das Diazomethan wurde aus N-Nitroso-toluol-4-sulfonmethylanid (FLUKA) nach dem Protokoll von deBoer et al. [deBoer, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1954] hergestellt.

AA, EPA, LA und die jeweiligen Produktpeaks wurden anhand der Retentionszeiten von authentischen Standardsubstanzen identifiziert. Die jeweiligen Retentionszeiten sind in Tabelle 2-7 aufgelistet. Zur Bestätigung der Identität von 17,18-EETeTr wurde zusätzlich GC/MS (vgl. Abschnitt 2.7.4) durchgeführt.

**Tabelle 2-7: Retentionszeiten von LA, AA, EPA, DHA und ihren Produkten in der RP-HPLC.**

	Metabolit	Retentionszeit [min]
LA-Metabolite	11-OH-LA-Methylester	33,6
	12-OH-LA-Methylester	35,0
	DDDA-Methylester	41,1
	LA-Methylester	44,2
AA-Metabolite	14,15-DHET	12,5
	11,12-DHET	13,7
	19-HETE	15,8
	20-HETE	16,0
	14,15-EET	23,5
	8,9-; 11,12-EET	25,0
	AA	33,6
EPA-Metabolite	17,18-DHETeTr	9,7
	19/20-OH-EPA	14,2
	17,18-EETeTr	19,6
	5,6-; 8,9-; 11,12-; 14,15-EETeTr	21,3
	EPA	29,4
DHA-Metabolite	19,20-DHDP	20,9
	21-OH-DHA	14,8
	22-OH-DHA	20,9
	19,20-EDP	23,0
	7,8-; 10,11-; 13,14-; 16,17-EDP	25,2
	DHA	32,2

Die RP-HPLC Trennung erfolgte mit der Säule Nucleosil 100-5C18HD (250 x 4 mm; Machery & Nagel).

AA, EPA, DHA und ihre Produkte wurden über einen linearen Gradienten von Acetonitril: Wasser: Essigsäure (50: 50: 0,1 (vol/vol/vol)) zu Acetonitril: Essigsäure (100:0,1 (vol/vol)) in 40 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt.

LA, LA-Produkte, sowie die LA-Methylester wurden mit einem linearen Gradienten von Acetonitril: Wasser: Essigsäure (29,5: 70,5: 0,1 (vol/vol/vol)) zu Acetonitril: Wasser: Essigsäure (59,5: 40,5: 0,1 (vol/vol/vol)) in 30 Minuten und einer anschließenden 15-minütigen Phase von Acetonitril: Essigsäure (100: 0,1 (vol/vol)) bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt.

### 2.7.2 Normal Phasen HPLC

Die NP-HPLC wurde zur Trennung von 19- und 20-HETE, von 19- und 20-HEPE und von 5,6-, 8,9- und 11,12-EET verwendet. Die Fraktionen wurden zu ihren jeweiligen Retentionszeiten in der RP-HPLC (siehe Tabelle 2-7) gesammelt, das Lösungsmittelgemisch mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt und die Proben im Lösungsmittelgemisch, das zur Trennung in der NP-HPLC verwendet wurde, gelöst.

Für die Trennung mit der NP-HPLC wurde die Säule CC 250/4 Nucleosil 100-5 (Macherey&Nagel) verwendet.

19- und 20-HETE bzw. 19- und 20-HEPE wurden mit einem linearen Gradienten von Hexan: Isopropanol: Essigsäure (99: 1: 0,1 (vol/vol/vol)) zu Hexan: Isopropanol: Essigsäure (98,3: 1,7: 0,1 (vol/vol/vol)) über 40 Minuten mit einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. 19-HETE eluierte vor 20-HETE, ebenso 19-HEPE vor 20-HEPE.

Die Trennung der EETs erfolgte isokratisch über 30 Minuten mit dem Lösungsmittelgemisch Hexan: Isopropanol: Essigsäure (99,6: 0,4: 0,1 (vol/vol/vol)) und einer Flussrate von 1,5 ml/min. Die EETs eluierten in der Reihenfolge: 11,12-EET, 8,9-EET und 5,6-EET.

### 2.7.3 Chiral Phasen HPLC

Die CP-HPLC wurde zur Trennung der Enantiomere von 11,12- und 14,15-EET, sowie von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP verwendet. Die Fraktionen wurden zu ihren jeweiligen Retentionszeiten in der RP-HPLC (siehe Tabelle 2-7) gesammelt, das



Lösungsmittelgemisch mit Hilfe des Rotationsverdampfers eingeengt und die Proben im Lösungsmittelgemisch, dass zur Trennung in der CP-HPLC verwendet wurde, gelöst.

Die Trennung von 11(R),12(S)-EET und 11(S),12(R)-EET bzw. 14(R),15(S)-EET und 14(S),15(R)-EET erfolgte mit der CP-HPLC Säule Chiralcel OD (250 x 4,6 mm mit Vorsäule Daicel, 2+D).

Die Trennung der Enantiomere von 11,12-EET erfolgte isokratisch innerhalb von 40 Minuten mit dem Lösungsmittel Hexan: Isopropanol: Essigsäure (98,8: 1,2: 0,05 (vol/vol/vol)) und einer Flussrate von 1 ml/min. 11(S),12(R)-EET eluierte zuerst, anschließend 11(R),12(S)-EET.

14,15-EET wurde isokratisch innerhalb von 120 Minuten mit Hexan: Isopropanol: Essigsäure (99,7: 0,3: 0,05 (vol/vol/vol)) und einer Flussrate von 1 ml/min in seine Stereoisomeren aufgelöst. 14(S),15(R)-EET eluierte vor 14(R),15(S)-EET.

Die CP-HPLC Säule Chiralcel OB (250 x 4,6 mm mit Vorsäule 50 x 4,6 mm, Daicel) wurde zur Trennung der Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP eingesetzt.

17,18-EETeTr konnte unter folgenden Bedingungen in seine Stereoisomeren getrennt werden: Die Lösungsmittelzusammensetzung war Hexan: Isopropanol: Essigsäure (99,7: 0,3: 0,05 (vol/vol/vol)), diese wurde isokratisch 60 Minuten lang mit einer Flussrate von 1 ml/min durch die CP-HPLC gepumpt. Dabei eluierte 17(R),18(S)-EETeTr vor 17(S),18(R)-EETeTr.

Die Trennung der Enantiomere von 19,20-EDP erfolgte isokratisch innerhalb von 50 Minuten in Hexan: Isopropanol: Essigsäure (99,5: 0,5: 0,05 (vol/vol/vol)) mit Flussrate von 1 ml/min. 19(R),20(S)-EDP eluierte vor 19(S),20(R)-EDP.

#### 2.7.4 Gas-Chromatographie / Massen-Spektrometrie

Die Gas-Chromatographie (GC) mit anschließender EI ("electron impact")-Massenspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Honeck (MDC, Berlin-Buch) mit der GC-MS QP5050A (Shimadzu) mit einer 30 m/0,25 mm Optima-1 Silica Kapillar Säule (25 mm Beschichtung, Macherey-Nagel) durchgeführt. An das System ist ein Computer mit der Software GC/MS Analysis Editor und GC/MS Postrun

Analysis angeschlossen. Als Trägergas wurde Helium und als Reagenzgas Methan verwendet.

17,18-EETeTr wurde zuerst mittels saurer Hydrolyse in 17,18-DHETeTr überführt. Dazu wurde die Probe in 50 µl Acetonitril aufgenommen, mit 1 ml Essigsäure:H<sub>2</sub>O (1:1) gemischt und über Nacht bei 200 rpm und 45 °C inkubiert. Das hydrolysierte 17,18-EETeTr wurde mit Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und die Probe in EtOH aufgenommen. Anschließend wurde 17,18-DHETeTr trimethylsilyliert wie bei Croft et al. [81] beschrieben.

Für die Analyse des methylierten und trimethylsilylierten 17,18-DHETeTr mit GC/MS wurde der Geräteofen eine Minute bei 100 °C gehalten, dann von 100° bis 300° C, mit einer Rate von 20° C pro Minute erhitzt und bei 300 °C für sechs Minuten gehalten. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der zum GC/MS-System zugehörigen Software GC/MS-Analysis-Editor, GC/MS-Postrun-Analysis und der zugehörigen Datenbank.

## **2.8 Tierversuche**

Alle verwendeten Mäuse wurden im Tierhaus des MDC Berlin gehalten und gegebenenfalls gezüchtet. Die verwendeten Lewisratten wurden im Tierhaus der Charité Berlin gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und zu Standardfutter mit 0,25 % NaCl (SNIFF Spezialitäten). Modifikationen der Bedingungen für Versuchszwecke werden im jeweiligen Abschnitt gesondert erwähnt. Die Tierversuche wurden mit dem Programm Instat Anova statistisch ausgewertet.

### **2.8.1 Verwendete Mausstämme für Analysen der Expression von Cyp4a12a, der 20-HETE Bildung und der sEH Aktivität**

Für Stammuntersuchungen zur Cyp4a-Isoform und 20-HETE Expression wurden 12 bis 15 Wochen alte männliche und weibliche Mäuse der folgenden Stämme verwendet: NMRI, FVB/N, C57BL/6 (Charles River Laboratories) und 129 Sv/J und Balb/c (DIMED Schönewalde). Alle Gruppen bestanden aus 6 bis 8 Tieren.

Behandlungen mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) wurden an jeweils 6 männlichen NMRI und C57BL/6 Mäusen (Charles River Laboratories) durchgeführt. Den Tieren wurde subcutan ein Pellet implantiert, das 5 mg DHT (Innovative Research of America) am Tag freisetzte. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt.

### 2.8.2 sEH knockout Mäuse

Der sEH knockout Stamm stammt aus dem Labor von Dr. Steve Weldon (Boehringer Mannheim). Die modifizierte embryonale Stammzelle stammte aus einer SV129/J Maus. Der Founder der sEH knockout war eine Sv129/J Maus, die zur Koloniebildung mit C57BL/6-Albino gekreuzt wurde.

Diese Kolonie wurde auf zwei unterschiedliche genetische Hintergründe zurückgekreuzt:

- C57BL/6-ByJ, die Rückkreuzung erfolgte über 9 Generationen (Boehringer),
- FVB/N, die Rückkreuzung erfolgte über 6 Generationen (Dr. Volkmar Gross, MDC).

Die sEH knockout Maus auf C57BL/6-ByJ Hintergrund wurde für Analysen zur sEH Aktivität in der Niere und Gefäßen verwendet. Die Präparationen der zytosolischen Fraktionen erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Die Präparationen der Mesenterialarterien wurden von Hantz Hercule (Gastwissenschaftler des MDC) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse getötet, der Bauchraum geöffnet, die Meseterialarterie vom Darm präpariert und unter dem Mikroskop von Fettgewebe befreit.

Mit sEH knockout Mäusen auf FVB/N Hintergrund wurden die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Zelllokalisierung der sEH durchgeführt. Die Tiere wurden dazu wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben präpariert.

### 2.8.3 Cre/loxP Mäuse

Die Generierung der Cyp4a12 transgenen loxP Maus wurde von Natascha Alelina aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Bader (MDC) durchgeführt. Hier wird

daher nur ein kurzer Ablauf der Prozedur wiedergegeben: In den Vorkern einer befruchteten Eizelle, präpariert aus dem Eileiter einer C57BL/6 Maus, wurde durch Mikroinjektion das oben beschriebene Cyp4a12a/loxP Konstrukt injiziert. Das Cyp4a12a/loxP Konstrukt inserierte in das Genom der Sv129/J Eizelle. Die gentechnisch veränderte Eizelle wurde einer scheinschwangeren Maus (C57BL/6) implantiert. Die Selektion der gentechnisch veränderten Nachkommen mit C57BL/6 Hintergrund, in denen das Cyp4a12a/loxP Konstrukt im Genom integriert vorlag, erfolgte über einer PCR-Analyse chromosomaler DNA (vgl. Abschnitt 2.1.6).

Christel Andrée (Labor von Dr. W.-H. Schunck) übernahm die Zucht der Cyp4a12a/loxP C57BL/6 Mäuse und kreuzte diese mit Sm22a/Cre Mäusen, die uns von Ruth Schmidt-Ullrich aus der Arbeitsgruppe Scheidereit (MDC) zur Verfügung gestellt wurden [STOCK Tg(Tagln-cre)<sup>1</sup>Her/J, The Jackson Laboratory; [82]]. Nachkommen aus dieser Zucht, doppelt positive, einfach positive, sowie doppelt negative Cre/loxP Mäuse, wurden auf die Expression von Cyp4a12a in Gefäßen und Organen untersucht.

#### 2.8.4 Verwendete Rattenstämme

Untersuchungen zur Nierenfunktion wurden von Dr. Uwe Hoff aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Duschka Dragun (Charité) an Lewisratten durchgeführt. Hier wird nur eine kurze Beschreibung des Versuches wiedergegeben: Den Lewisratten wurde in einer Operation die rechte Niere entfernt. Je nach Tiergruppe wurde die verbliebene Niere nicht behandelt, einer warmen Ischämie/Reperfusion (I/R) oder einer HET0016 Behandlung und warmer I/R unterzogen. Die warme I/R erstreckte sich über 45 Minuten. Die HET0016 Behandlung erfolgte durch intrarenale Infusion von 50 µg HET0016/g Nierengewicht 15 Minuten vor I/R. 2 Tage nach der Behandlung wurden die Tiere getötet und die Niere für die Mikrosomenpräparation entnommen. Alle Tiergruppen bestanden aus 6 bis 8 Tieren.

Untersuchungen zur Herzfunktion wurden von Kollegen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Norbert Hübner (MDC) an WKY, SHHF und SHRSP Ratten durchgeführt [83]. Zytosolische Fraktionen wurden aus tiefgefrorenen Herzen und Nieren dieser Tiere gewonnen (vgl. Abschnitt 2.3.1). Alle Tiergruppen bestanden aus 3 bis 10 Tieren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung, heterologe Expression und enzymatische Eigenschaften der Cyp4a-Isoformen der Maus

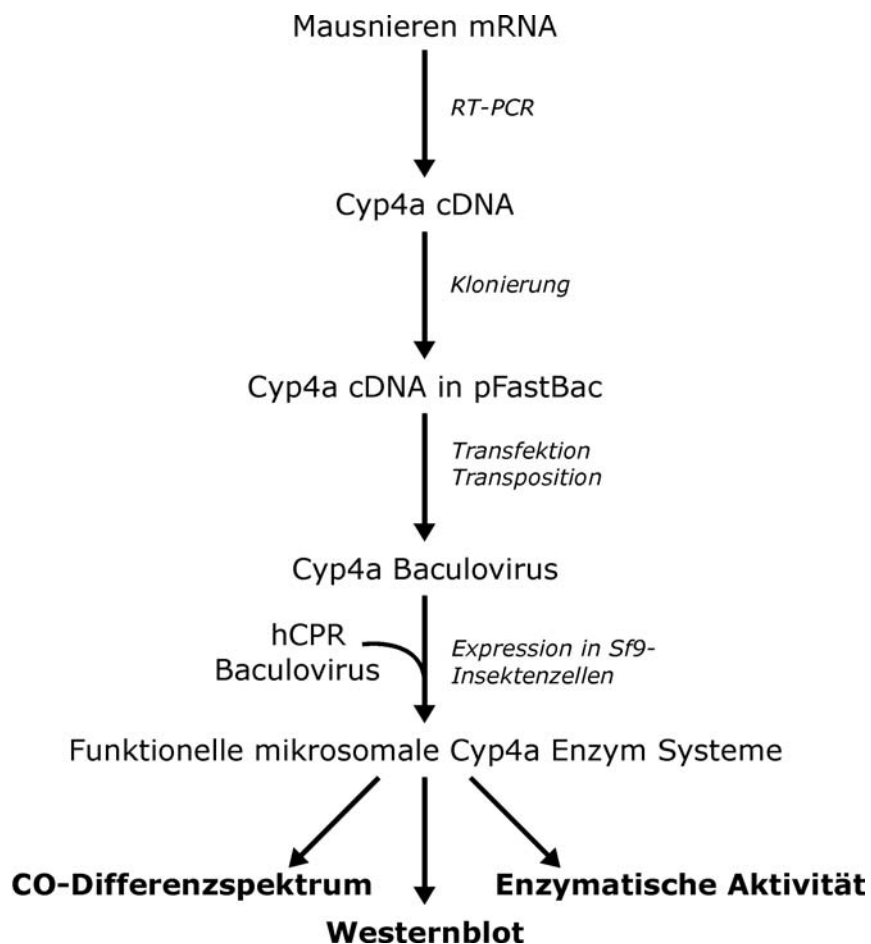
##### **Kapitelübersicht:**

Ziel dieses Teiles der Arbeit war die Klonierung von vier Cyp4a-Isoformen der Maus, ihre anschließende Expression als rekombinante Proteine und die Untersuchung ihrer enzymatischen Eigenschaften.

Dazu wurde mittels RT-PCR aus Mausnieren- bzw. Mausleber-mRNA die cDNA der Cyp4a-Isoformen gewonnen. Durch anschließende Klonierung in pFastBac1, Transposition in ein Bacmid und Transfektion von *Sf9*-Insektenzellen konnten rekombinante Baculoviren hergestellt werden. Durch Koexpression der einzelnen Cyp4a-Isoformen mit der hCPR konnten spektral intakte und enzymatisch aktive CYP/CPR Systeme erzeugt werden, die zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der einzelnen Isoformen herangezogen wurden. In Abbildung 3-1: ist ein Ablaufschema von Klonierung und heterologer Expression dargestellt.

Die Isoformen Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b und Cyp4a14 wurden erfolgreich kloniert (Kapitel 3.1.1) und in Insektenzellen heterolog exprimiert (Kapitel 3.1.2). Koexpressionen mit der hCPR ergaben spektral intakte Proteine (Abbildung 3-2), die bei immunchemischem Nachweis im Westernblot ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 58 kDa hatten (Abbildung 3-3), und enzymatische Aktivität aufwiesen.

Alle vier Enzyme waren hoch aktive LA Hydroxylasen und bildeten 11- und 12-Hydroxy-LA mit spezifischer Regioselektivität (Kapitel 3.1.3.1, Abbildung 3-5, Tabelle 3-2). Nur Cyp4a12a und Cyp4a12b waren AA-Hydroxylasen und bildeten als Primärprodukte 19- und 20-HETE (Kapitel 3.1.3.2, Abbildung 3-8, Abbildung 3-9, Tabelle 3-3). Cyp4a12a und Cyp4a12b metabolisierten auch EPA, dabei katalysierten sie neben der Hydroxylierung von EPA zu 19- und 20-Hydroxy-EPA auch die Epoxydation der  $\omega$ -3 Doppelbindung von EPA zu 17,18-Epoxy-EPA (Kapitel 3.1.3.3, Abbildung 3-13, Abbildung 3-16, Tabelle 3-4). Während Cyp4a12a hauptsächlich 17(R),18(S)-Epoxy-EPA bildete, zeigte Cyp4a12b keine ausgeprägte Stereoselektivität bei der Epoxydation von EPA (Abbildung 3-15).



**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Gewinnung von funktionellen CYP/CPR Systemen.**

### 3.1.1 Gewinnung der cDNA und Sequenzidentität der Cyp4a-Isoformen der Maus

Die vier Cyp4a-Isoformen der Maus wurden im Labor von Dr. W.-H. Schunck kloniert und zur anschließenden Expression rekombinanter Proteine verwendet. Die cDNAs der Cyp4a-Isoformen wurden mittels RT-PCR in voller Länge generiert (vgl. Abschnitt 2.1.3 in Material und Methoden). Die spezifischen Primer für Cyp4a10 und Cyp4a14 ergaben RT-PCR-Produkte mit erwarteter kodierender Sequenz, abgesehen von stammspezifischen Variationen. Mit den Primern für Cyp4a12 wurden erstmals zwei verschiedene, nah verwandte Cyp4a12-Gene vervielfältigt.

Die Benennung der Cyp4a-Isoformen folgt der für die jeweilige Sequenz vorgeschlagenen Nomenklatur von Nelson et al. ([9]; <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

#### 3.1.1.1 Sequenzidentität von Cyp4a10

Die Cyp4a10 DNA wurde aus einer männlichen NMRI Maus kloniert und wies eine 100 %ige Übereinstimmung mit der korrespondierenden mRNA (AK002528) und der genomischen Sequenz (contig NT\_039264) von C57BL/6 Mäusen auf. Die cDNA unterschied sich jedoch in zwei Positionen von der mRNA von FVB/N Mäusen (NM\_010011), die als provisorische NCBI Referenzsequenz für Cyp4a10 ausgewiesen ist: 190A>C und 207A>C (vom ATG Start-Codon aus gezählt), die zu Aminosäure Substitutionen von Gln zu Lys und Gln zu His in den Positionen 64 und 69 führen (NMRI und C57BL/6 vs. FVB/N, vgl. Tabelle 3-1).

#### 3.1.1.2 Sequenzidentität von Cyp4a12a

Mit dem Cyp4a12-spezifischen Primerpaar wurden cDNA Klone aus Nieren-RNA von NMRI und C57BL/6 gewonnen, deren Sequenzen mit der kodierenden Sequenz des MGC25972 Gens (C57BL/6 contig NT\_039264) vollständig übereinstimmten. Die kodierte CYP-Isoform wurde als "Cyp4a10-like" oder "similar to P450 4A8" auf contig NT\_039264 bezeichnet, wird jedoch in Übereinstimmung mit Nelson et al. 2004 [9] im Folgenden als Cyp4a12a bezeichnet. cDNA Sequenzen waren bisher nur für FVB/N Mäuse verfügbar (BC014721, NM\_177406) und unterschieden sich von denen aus NMRI und C57BL/6 durch einen nicht-synonymen (391A>C; Leu anstelle von Met an Aminosäureposition 131) und einem stillen Nukleotidaustausch (1233C>G, vgl. Tabelle 3-1).

#### 3.1.1.3 Sequenzidentität von Cyp4a12b

Das ursprünglich "Cyp4a12" benannte Gen im C57BL/6 Genom (contig NT\_039264) liegt ungefähr 112 kbp downstream von Cyp4a12a. Hier wird es in Übereinstimmung mit Nelson et al. 2004 ([9], 2004; <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) als Cyp4a12b bezeichnet. Die kodierenden Sequenzen von Cyp4a12a und Cyp4a12b unterscheiden sich nur in 21 Nukleotiden, die zu 10 Aminosäureaustauschen führen. Das verwendete Primerpaar führte zu einer Amplifikation beider Sequenzen, Cyp4a12a und Cyp4a12b. Um die Cyp4a12b cDNA

anzureichern, wurde das RT-PCR Produkt mit *AvrII* verdaut, das nur Cyp4a12a, nicht jedoch Cyp4a12b spaltet. Auf diesem Wege wurden Klone aus C57BL/6 Leber mRNA gewonnen, die eine 100 %ige Übereinstimmung mit der vorausgesagten kodierenden Sequenz für das Cyp4a12b-Gen („Cyp4a12“ auf contig NT\_039264) aufwiesen. Verglichen mit der provisorischen NCBI Referenzsequenz für die „Cyp4a12“ mRNA (NM\_172306, aus einem nicht spezifizierten Stamm) existiert ein Nukleotidaustausch 494G>A, der in einem His (contig NT\_039264 und eigene cDNA Sequenz) anstelle eines Val an Aminosäureposition 165 resultiert (vgl. Tabelle 3-1).

#### 3.1.1.4 Sequenzidentität von Cyp4a14

Die aus NMRI Mäusen geklonte Cyp4a14 cDNA zeigte mit einer Ausnahme (13T>G vom ATG Start-Codon aus gezählt) eine 100 %ige Übereinstimmung mit der kodierenden Region der mRNA Referenzsequenz NM\_007822 (C57BL/6 x CBA) und zu der vorausgesagten Sequenz des C57BL/6 Genoms (contig NT039264). Aufgrund dieses Polymorphismus, der auch in anderen Mausstämmen beobachtet wurde, ist die Aminosäureposition 5 im Cyp4a14 Protein von einem Val in NMRI, aber von einem Leu in C57BL/6 besetzt (vgl. Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-1: Sequenzidentitäten der vier Cyp4a-Isoformen der Maus.**

(I) Cyp	Genomische DNA aus C57BL/6	(II) Referenz cDNAs	Eigene cDNAs	Sequenzunterschiede eigene cDNA zu
4a10	„Cyp4a10“ (contig NT_039264)	C57BL/6: AK002528	NMRI Niere: 100 % (I) 100 % (II)	FVB/N: 190A>C → 64Gln>Lys 207A>C → 69Gln>His
4a12a	„Cyp4a10 like“, „similar to P450 4A8“ MGC25972 (contig NT_039264)	FVB/N: BC014721 NM_177406	NMRI & C57BL/6 Niere: 100 % (I) 2 Austausche zu (II)	FVB/N: 391A>C → 131Met>Leu 1233C>G (still)
4a12b	„Cyp4a12“ (contig NT_039264)	nicht spezifizierter Stamm: NM_172306	C57BL/6 Leber: 100 % (I) 1 Austausch zu (II)	Referenz Sequenz 494G>A → 165Val>His
4a14	Cyp4a14 (contig NT_039264)	C57BL/6xCBA: NM_007822	NMRI Niere 1 Austausch zu (I) 1 Austausch zu (II)	C57BL/6 & Referenz Sequenz 13T>G → 5Leu>Val

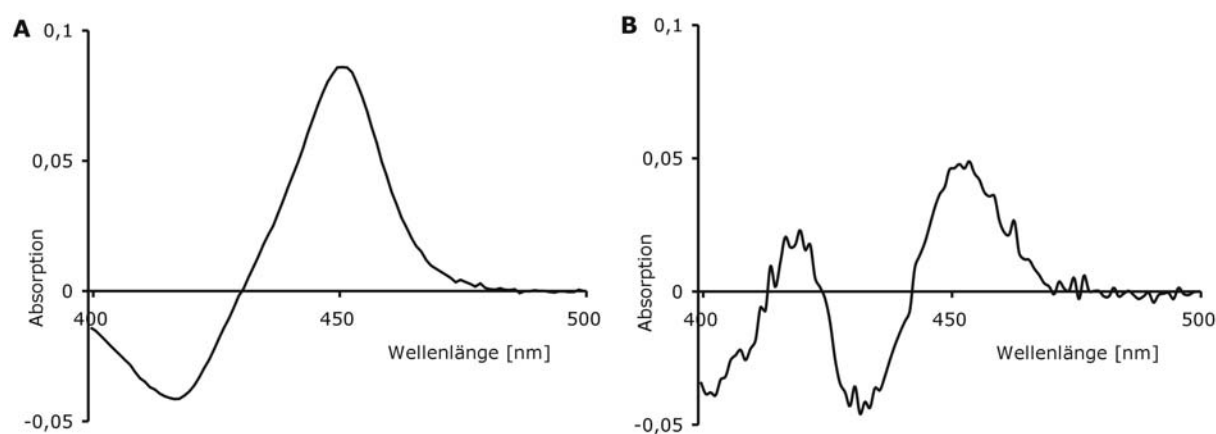


### 3.1.2 Klonierung und heterologe Expression der Cyp4a-Isoformen in Sf9-Insektenzellen

Die in Abschnitt 3.1.1 vorgestellten cDNAs wurden in den Vektor pFastBac1 kloniert und mit dem Baculovirus-Expressionssystem in Sf9-Insektenzellen heterolog exprimiert (vgl. Abschnitt 2.2.5 in Material und Methoden). Um enzymatisch aktive CYP Systeme zu gewinnen, wurden die Cyp4a-Isoformen mit der humanen Cytochrom P450 Reduktase (hCPR) koexprimiert. Durch Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation wurde die mikrosomale Fraktion der Insektenzellen gewonnen, in der sowohl die CYP Komponente als auch die hCPR angereichert vorlagen.

#### 3.1.2.1 Spektrale Analyse heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen

Spektral intakte CYP Komponenten wurden anhand der Ausbildung des charakteristischen Absorptionsspektrums bei 450 nm in CO-Differenzspektren nachgewiesen (Abbildung 3-2). Über die Absorption bei 450 nm wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon=91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  die CYP Konzentration errechnet [6].



**Abbildung 3-2: Charakteristisches CO-Differenzspektrum (A) einer Einzelexpression von Cyp4a12a und (B) einer Koexpression von Cyp4a12a und der hCPR.**

In beiden Fällen handelt es sich um das CO-Differenzspektrum der mikrosomalen Zellfraktion einer Expression in Sf9-Insektenzellen. Funktionelle CYP-Enzyme absorbieren bei 450 nm. Bei 420 nm absorbieren CYP-Abbauprodukte und exogen zugesetztes Häm. Im Vergleich zu den Einzelexpressionen fiel bei Koexpressionen mit der hCPR die Ausbeute an Cyp4a Protein geringer aus. Die CO-Differenzspektren waren charakteristisch für alle vier untersuchten Cyp4a-Isoformen.

Nach Optimierung der Expressionen durch Variation der MOI („multiplicity of infection“) wurden 120 – 250 nmol CYP/l Kultur erzielt. Für den Nachweis der rekombinanten Cyp4a-Isoformen im Westernblot wurden Einzelexpression mit einem CYP-Anteil von 260 pmol/mg (Cyp4a10), 132 pmol/mg (Cyp4a12a), 242 pmol/mg (Cyp4a12b) und 169 pmol/mg (Cyp4a14) mikrosomalem Protein verwendet.

Die Koexpressionen der einzelnen Cyp4a-Isoformen mit der hCPR wurden dahingehend variiert, dass ein stöchiometrisches Verhältnis in der CYP/hCPR-Konzentration erreicht wurde. Wie auch in anderen CYP/CPR-Expressionen beobachtet, führte die Koexpression aus nicht bekannten Gründen zu einer geringeren CYP Konzentration. Enzymologische Untersuchungen wurden mit Mikrosomen durchgeführt, die eine CYP-Konzentration von  $107,5 \pm 9,0$  pmol/mg (Cyp4a10),  $60,5 \pm 15,9$  pmol/mg (Cyp4a12a),  $77,5 \pm 7,1$  pmol/mg (Cyp4a12b) und  $105,0 \pm 24,6$  pmol/mg (Cyp4a14) mikrosomalem Protein aufwiesen ( $n > 3$ ).

Die hCPR Komponente wurde mit Cytochrom C als artifiziellm Elektronenakzeptor nachgewiesen. Die gemessene Aktivität konnte über die spezifische Aktivität der gereinigten Reduktase (4,5 U/nmol) in Konzentrationen umgerechnet werden. Die Reduktasekonzentration in den Mikrosomen lag bei  $115,8 \pm 5,2$  nmol/mg (Cyp4a10),  $84,0 \pm 43,9$  nmol/mg (Cyp4a12a),  $100,0 \pm 24,7$  nmol/mg (Cyp4a12b) und  $100,8 \pm 18,4$  nmol/mg (Cyp4a14) mikrosomalem Protein ( $n > 3$ ).

Für die Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der Cyp4a-Isoformen wurden Mikrosomen aus heterologen Koexpressionen der jeweiligen Cyp4a-Isoform mit der hCPR (CYP/CPR System) verwendet. CYP und hCPR lagen im Verhältnis von 1:1 bis 1:1,2 (Cyp4a10), 1:0,6 bis 1:2,5 (Cyp4a12a), 1:1,1 bis 1:1,4 (Cyp4a12b) und 1:0,9 bis 1:1 (Cyp4a14) vor.

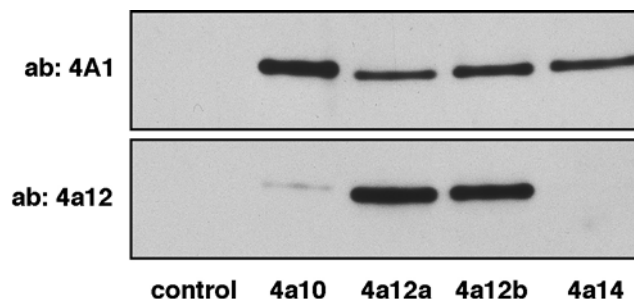
### *3.1.2.2 Westernblotanalyse heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen*

Die heterolog exprimierten Cyp4a-Isoformen konnten auf Proteinebene im Westernblot nachgewiesen werden. Dazu wurden die Proteine der mikrosomalen Fraktion der *Sf9*-Zellen in einem SDS Gel elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Cyp4a-Isoformen wurden in einer Immunreaktion nachgewiesen.

Zum spezifischen Nachweis der Cyp4a-Isoformen wurden zwei unterschiedliche Antikörper, ab-4A1 und ab-4a12, verwendet. Der Antikörper ab-4A1 ist gegen gereinigtes CYP4A1 aus der Ratte. In Abbildung 3-3 kann man vier deutliche Banden erkennen, die indizieren, dass ab-4A1 alle vier Cyp4a-Isoformen der Maus detektiert.

Der Antikörper ab-4a12 ist gegen das synthetische Peptid NH<sub>3</sub>-SRRIQLQDEEELEKLKKKRR-COOH. Die Sequenz ist spezifisch für Cyp4a12a und liegt zwischen dem G und dem H Loop. Zum Design und zur Herstellung des peptidspezifischen Antikörpers siehe Abschnitt 2.5.1 in Material und Methoden. Der polyklonale Antikörper aus Kaninchen reagierte effizient mit rekombinanten Cyp4a12a und Cyp4a12b und zeigte eine leichte Kreuzreaktivität mit Cyp4a10. Der peptidspezifische ab-4a12 reagierte nicht mit Cyp4a14.

In der SDS-PAGE befanden sich die Cyp4a Isoformen zwischen der 50 und der 64 kDa Bande des Proteinstandards. Die daraus geschätzten scheinbaren Molekulargewichte der rekombinanten CYP4a Proteine lagen bei ca. 58 kDa. Aus den Aminosäuresequenzen leiten sich folgende Massen ab: 58,3 kDa (Cyp4a10), 58,3 kDa (Cyp4a12a), 58,3 kDa (Cyp4a12b) und 58,7 kDa (Cyp4a14).



**Abbildung 3-3: Nachweis der heterolog in Sf9-Insektenzellen exprimierten Cyp4a-Isoformen im Westernblot und Spezifitätsnachweis der unterschiedlichen Antikörper.**

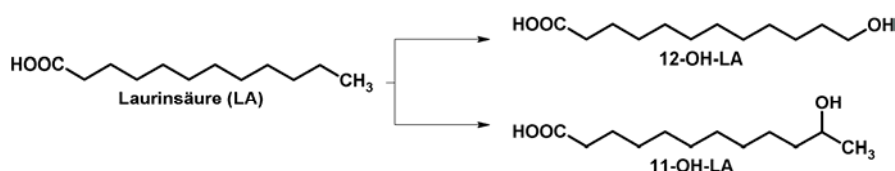
Als Kontrolle wurden 8 µg Protein Sf9-Insektenzellenmikrosomen ohne Überexpression einer Cyp4a-Isoform aufgetragen. Von den vier mikrosomalen rekombinanten Cyp4a-Isoformen wurden jeweils 0,2 pmol aufgetragen. Der Antikörper gegen das CYP4A1 aus der Ratte (ab-4A1) zeigte Immunreaktionen mit allen vier Cyp4a-Isoformen der Maus. Der peptidspezifische Antikörper gegen Cyp4a12a (ab-4a12) detektierte Cyp4a12a und Cyp4a12b effektiv. Ab-4A12 zeigte leichte Kreuzreaktivität mit Cyp4a10 und keinerlei Reaktivität mit Cyp4a14.

### 3.1.3 Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften rekombinanter Cyp4a-Isoformen der Maus

Im Folgenden wird die Analyse der katalytischen Eigenschaften der in Abschnitt 3.1.1 vorgestellten Cyp4a-Isoformen bei der Metabolisierung von Fettsäuren gezeigt. Bei AA und EPA Umsätzen wurde zudem der Einfluss von Cytochrom b5 (Cyt b5) auf die Monooxygenasereaktion untersucht. Dazu wurden in einem Assay [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-markierte LA, AA und EPA mit CYP/CPR Systemen mit und ohne Cyt b5 inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von NADPH gestartet und durch Zugabe von Zitronensäure gestoppt (vgl. Abschnitt 2.6.2 in Material und Methoden). Das Extrakt dieser Inkubationen wurde mit RP-HPLC aufgetrennt und die Peakflächen mit der Software Class-VP von Shimadzu integriert. Kinetische Analysen wurden mit Enzymkinetics Sigmaplot7 (SPSS) durchgeführt.

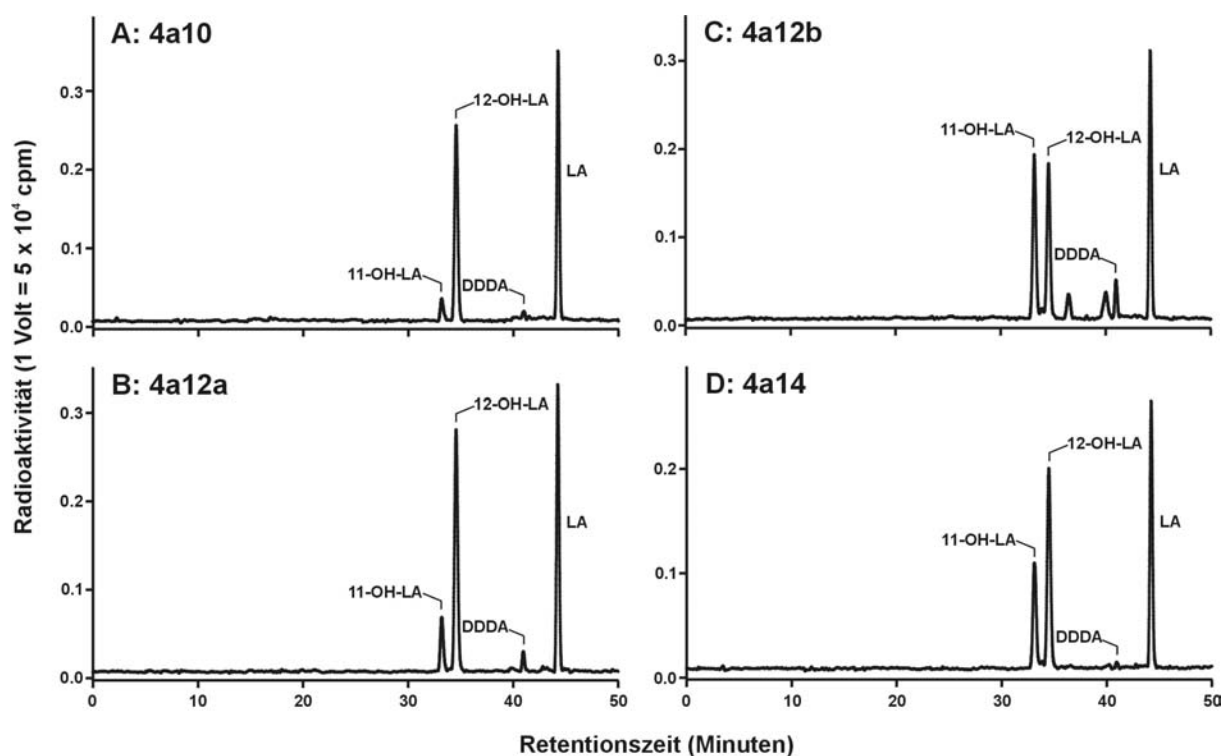
#### 3.1.3.1 Laurinsäure-Metabolismus heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen

Die Primärprodukte der Cyp4a-katalysierten LA Hydroxylierung waren 11- und 12-Hydroxylaurinsäure (OH-LA) (Abbildung 3-4, Abbildung 3-5). Die Identität dieser Metabolite wurde anhand authentischer Standardsubstanzen verifiziert. Das Verhältnis zwischen 12-OH-LA und 11-OH-LA war Isoform-spezifisch (Tabelle 3-2). Die Regioselektivität war bei Cyp4a10 mit 94:6 am größten, gefolgt von Cyp4a12a mit 83:17 und Cyp4a14 mit 62:38. Cyp4a12b zeigte nahezu keine Regioselektivität mit einem Verhältnis von 12-OH-LA zu 11-OH-LA von 52:48. Die Regioselektivitäten waren unabhängig von Substratkonzentration und Cyt b5 Zugabe.



**Abbildung 3-4: Laurinsäure und ihre Hydroxylierungsprodukte.**

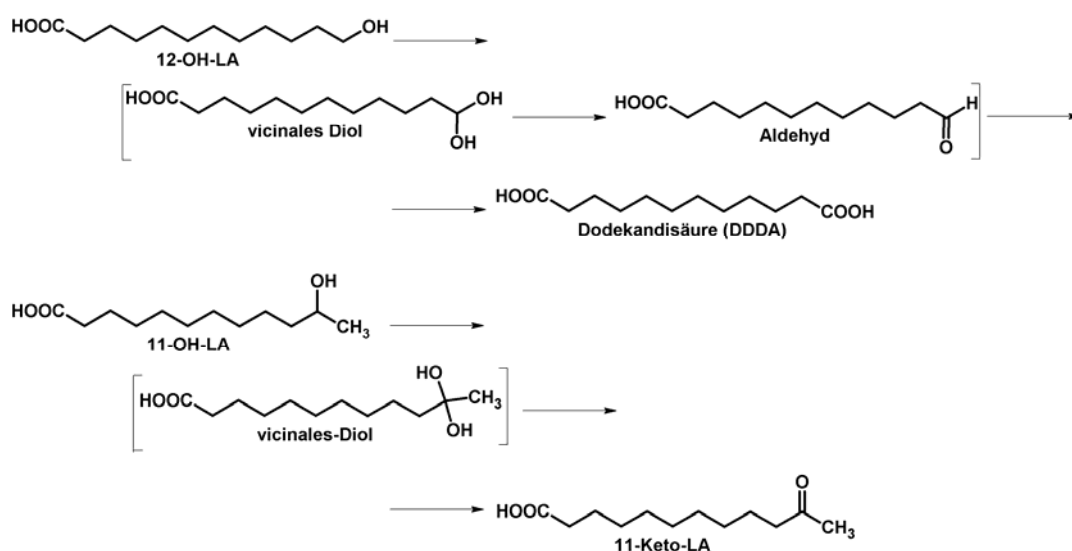
Laurinsäure wurde durch die Cyp4a-Isoformen zu 11-Hydroxylaurinsäure (11-OH-LA) und 12-Hydroxylaurinsäure (12-OH-LA) hydroxyliert.



**Abbildung 3-5: Laurinsäuremetabolismus rekombinanter Cyp4a-Enzyme aus der Maus.**

Dargestellt sind repräsentative RP-HPLC Chromatogramme mit dem Metabolitenprofil von Cyp4a10 (A), Cyp4a12a (B), Cyp4a12b (C) und Cyp4a14 (D). Die Cyp4a katalysierte Hydroxylierung von LA zu 11- und 12-Hydroxylaurinsäure (OH-LA) erfolgte mit unterschiedlicher Regioselektivität. Die Reaktionen wurden in 100 µl mit 10 pmol Cyp und 30 µM LA innerhalb von 5 Minuten durchgeführt. Zur Herstellung der Methylester wurde der Extrakt mit Diazomethan behandelt und anschließend durch RP-HPLC getrennt (vgl. Abschnitt 2.7.1 in Material und Methoden). Die Methylester der Primärprodukte eluierten bei 33,6 Minuten (11-OH-LA) und 35 Minuten (12-OH-LA), der Methylester der Dodekandisäure (DDDA), die durch weitere Oxidation von 12-OH-LA entstand (vgl. Abbildung 3-6), eluierte bei 41,1 Minuten und der Methylester nicht metabolisierter LA bei 44,2 Minuten. Weitere Produkte, die nur durch Cyp4a12b gebildet wurden und zwischen 12-OH-LA und DDDA eluierten, wurden nicht identifiziert, es könnte sich aber beispielsweise um oxidierte 11-OH-LA handeln (vgl. Abbildung 3-6). Eine quantitative Auswertung der enzymatischen Aktivitäten und der Regioselektivität der einzelnen Cyp4a-Isoformen gegenüber LA sind in Tabelle 3-2 aufgelistet.

Verlängerte Inkubationszeiten oder erhöhte Enzymkonzentrationen führten zur starken Bildung eines Sekundärmetaboliten, der mittels GC-MS Analyse als Dodekandisäure (DDDA) identifiziert wurde (nicht dargestellt). Primärprodukte und DDDA konnten nach Bildung der korrespondierenden Methylester in der RP-HPLC vollständig getrennt werden (Abbildung 3-5). Ohne vorherige Veresterung komigrierte 11-OH-LA mit DDDA bei gleichen HPLC Bedingungen. DDDA trat als Sekundärprodukt bei allen rekombinanten Cyp4a-Isoformen auf. Der Ablauf der schrittweisen weiteren Hydroxylierung von 12-OH-LA zu DDDA ist in Abbildung 3-6 dargestellt.



**Abbildung 3-6: Schrittweise Hydroxylierung von 12-OH-Laurinsäure zu Dodekandisäure und von 11-OH-LA zu 11-Keto-Laurinsäure.**

11- und 12-Hydroxylaurinsäure (11-, 12-OH-LA) können schrittweise durch die Cyp4a-Enzyme über ein vicinales Diol weiter oxidiert werden. Als Endprodukt entstehen dabei aus 12-OH-LA DDDA und aus 11-OH-LA 11-Keto-LA. Das vicinale Diol und das Aldehyd sind kurzlebige Intermediate und nicht in der RP-HPLC nachweisbar.

Kinetische Analysen der Cyp4a-Isoformen zeigten, dass LA mit V<sub>max</sub> Werten zwischen 40 und 76 nmol/nmol/min und K<sub>m</sub> Werten zwischen 2 und 16 µM hydroxyliert wurde (Tabelle 3-2).

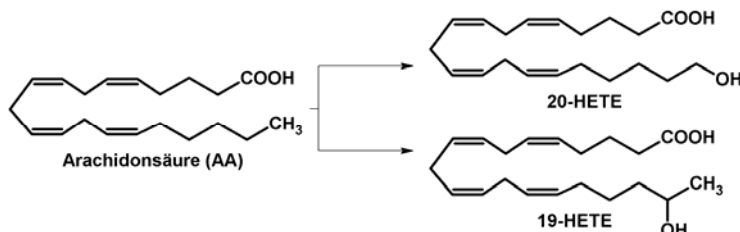
**Tabelle 3-2: Metabolismus von Laurinsäure durch rekombinante Cyp4a-Enzyme.**

CYP	K <sub>m</sub> -Wert (µM)	V <sub>max</sub> -Wert (nmol/nmol/min)	11-OH-LA Produktverteilung (%) <sup>a)</sup>	12-OH-LA Produktverteilung (%) <sup>a)</sup>
4a10	2 ± 0,4	55 ± 3	6	94
4a12a	16 ± 6,0	76 ± 17	17	83
4a12b	2 ± 0,6	40 ± 3	52	48
4a14	8 ± 2,0	40 ± 5	38	62

<sup>a)</sup> Die Produkte wurden mittels RP-HPLC getrennt und quantifiziert (vgl. Abbildung 3-5). Die Werte sind Mittelwerte von Experimenten mit mindestens drei unterschiedlichen Mikrosomenpräparationen. Der Standardfehler war kleiner als 10 % des Mittelwertes und die Produktverteilung unabhängig von der LA Konzentration im Rahmen der für die Kinetik genutzten Konzentrationen (1 bis 50 µM).

### 3.1.3.2 Arachidonsäuremetabolismus heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen

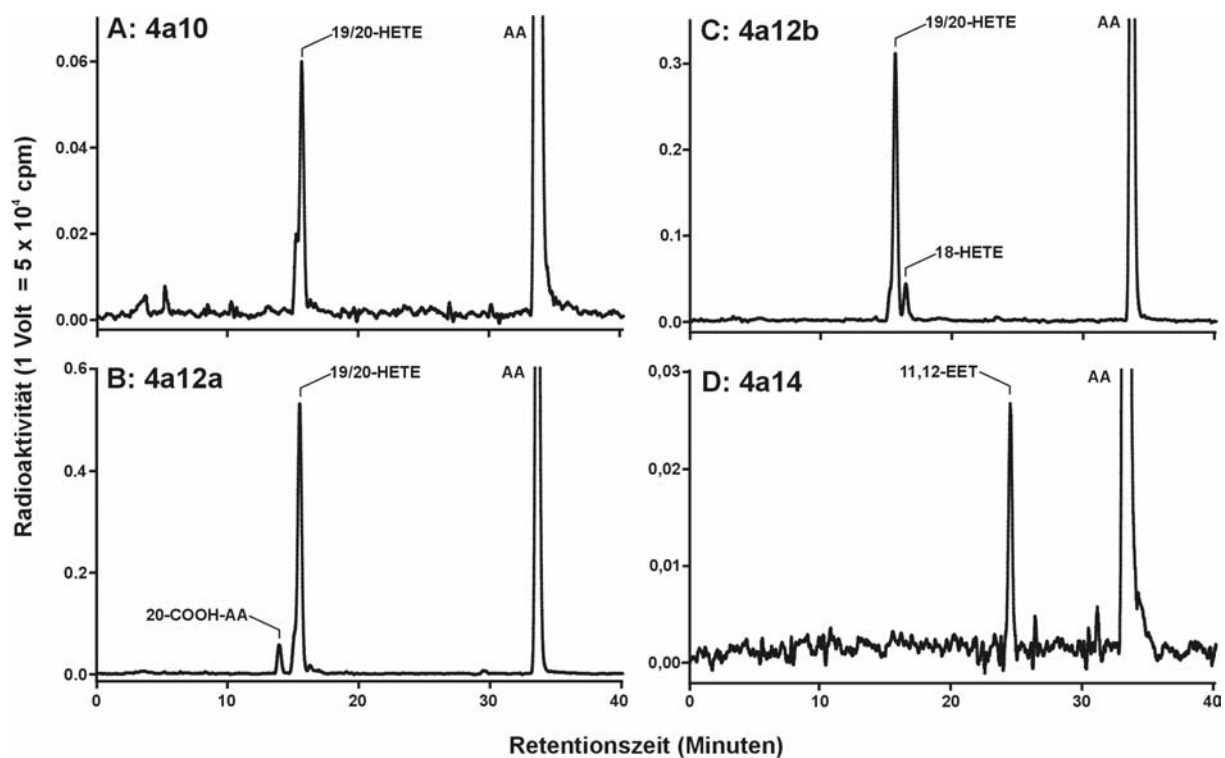
Im Gegensatz zu Laurinsäure, die mit hohen Umsatzraten von allen vier Maus Cyp4a-Isoformen hydroxyliert wurde, wurde Arachidonsäure nur von Cyp4a12a und Cyp4a12b effizient metabolisiert (Abbildung 3-8B, Abbildung 3-1C und Tabelle 3-3). Haupt-Primärprodukte waren 20- und 19-HETE (Abbildung 3-7), die in der RP-HPLC eine nahezu gleiche Retentionszeit aufwiesen.



**Abbildung 3-7: Arachidonsäure und ihre Hydroxylierungsprodukte.**

Arachidonsäure wurde durch Cyp4a12a und Cyp4a12b zu 19-Hydroxyeicosatetraensäure (19-HETE) und 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) hydroxyliert.

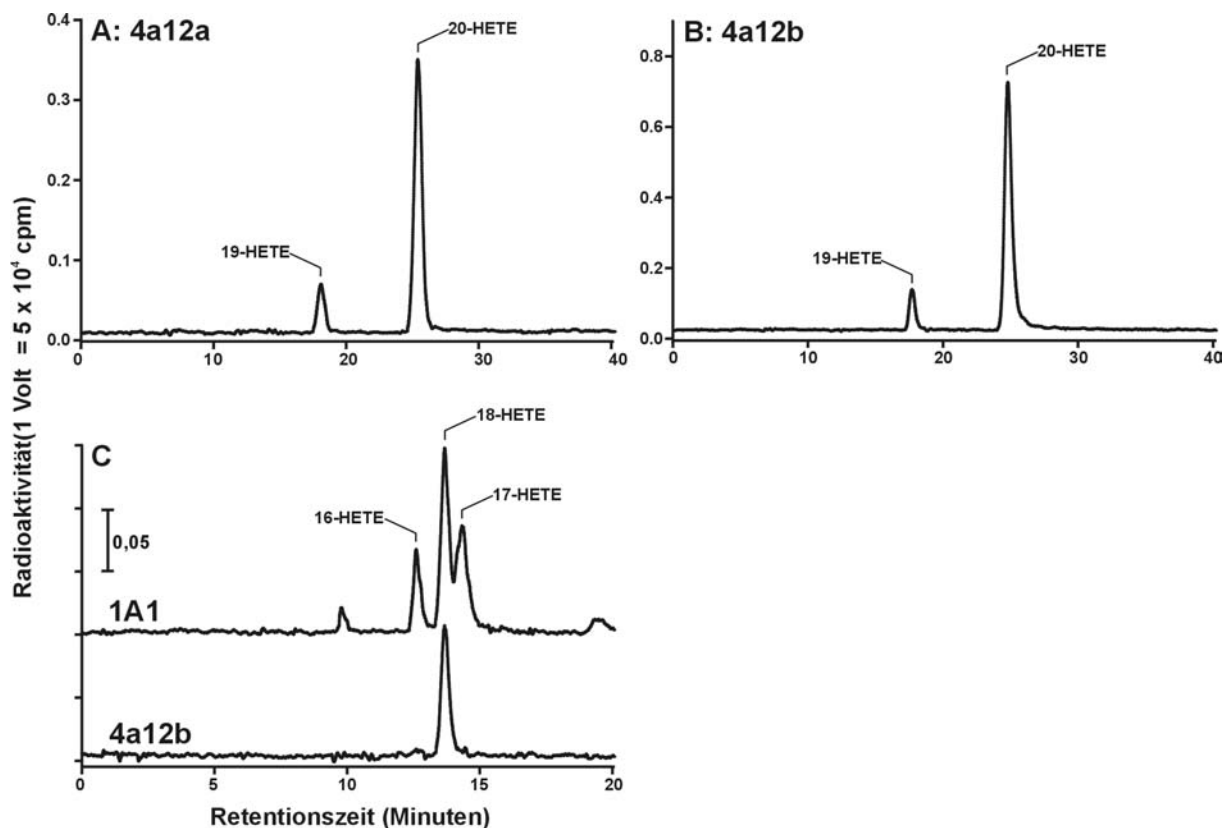
Eine anschließende vollständige Auflösung mittels NP-HPLC zeigte, dass sowohl Cyp4a12a als auch Cyp4a12b 20- und 19-HETE in einem Verhältnis von 85:15 bilden (Abbildung 3-9A und B, Tabelle 3-3). Cyp4a12b bildete ein weiteres Primärprodukt, das in der RP-HPLC eine Retentionszeit von 16,3 Minuten aufwies (Abbildung 3-8C) und mit 18-HETE in der NP-HPLC komigrierte (Abbildung 3-9C). 18-HETE repräsentiert ca. 12 % des Gesamtproduktes bei Cyp4a12b-katalysierter AA Hydroxylierung, war bei Umsätzen mit Cyp4a12a jedoch nicht detektierbar.



**Abbildung 3-8: Arachidonsäuremetabolismus rekombinanter Cyp4a-Enzyme aus der Maus.**

Dargestellt sind repräsentative RP-HPLC Chromatogramme mit dem Metabolitenprofil von Cyp4a10 (A), Cyp4a12a (B), Cyp4a12b (C) und Cyp4a14 (D). Zu beachten ist die 10- bis 20-fach erhöhte Skalierung in Abbildung 3-8A und Abbildung 3-8D gegenüber den Abbildung 3-8B und Abbildung 3-8C, um die geringen Mengen der von Cyp4a10 und Cyp4a14 gebildeten Metabolite im Vergleich zu der effizienten Produktbildung von Cyp4a12a und Cyp4a12b zeigen zu können. Die Reaktionen wurden in 400  $\mu$ l mit 200 pmol Enzym (Cyp4a10 und Cyp4a14), bzw. 40 pmol Enzym (Cyp4a12a und Cyp4a12b) und 10  $\mu$ M AA innerhalb von 10 Minuten durchgeführt. Die Retentionszeiten der Metabolite waren 13,9 (20-COOH-AA), 15,5 (19-/20-HETE), 16,4 (18-HETE) und 24,7 Minuten (11,12-EET) und korrespondierten mit den authentischen Standardkomponenten. AA eluierte bei 33 Minuten. Die quantitative Analyse der Enzymaktivitäten und der Regioselektivitäten der einzelnen Cyp4a-Isoformen gegenüber AA sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

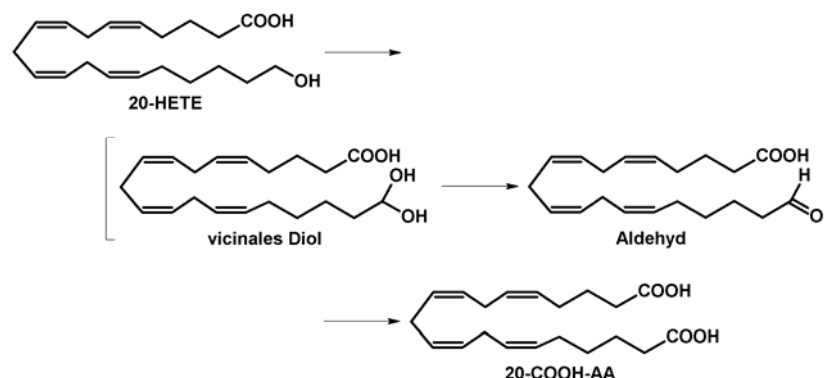




**Abbildung 3-9: Analyse der Regioselektivität von Cyp4a12a und Cyp4a12b bei der Hydroxylierung von Arachidonsäure.**

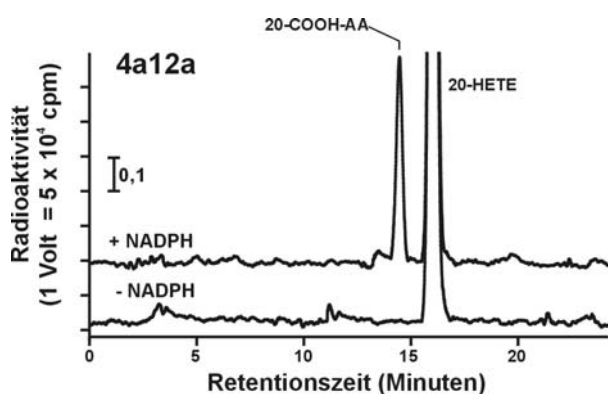
Die bei 15,5 Minuten in der RP-HPLC eluierende Fraktion (vgl. Abbildung 3-8) wurde gesammelt und mit NP-HPLC weiter getrennt (drei oder mehr unterschiedliche Ansätze). Abbildung 3-9A zeigt ein repräsentatives NP-HPLC Chromatogramm zur Regioselektivität von Cyp4a12a. In Abbildung 3-9B ist die Regioselektivität von Cyp4a12b gezeigt. Das zusätzliche Produkt, das durch Cyp4a12b gebildet wurde und bei 16,4 Minuten in der RP-HPLC eluierte (vgl. Abbildung 3-8C) komigrierte mit 18-HETE in der NP-HPLC (Abbildung 3-9C). Das für den Vergleich verwendete Gemisch von 16-, 17- und 18-HETE wurde mit humanem CYP1A1 hergestellt [84].

Ähnlich wie beim Metabolismus von LA war auch bei der Hydroxylierung von AA Sekundärproduktbildung zu beobachten. Der Sekundärmetabolit komigrierte in der RP-HPLC mit authentischer Eicosatetraensäure (20-COOH-AA) (Abbildung 3-8B). Der gleiche Metabolit wurde in NADPH- und Cyp4a12a/b-abhängiger Reaktion auch direkt aus 20-HETE gebildet (Abbildung 3-10, Abbildung 3-11). Kontrollmikrosomen mit hCPR, jedoch ohne Cyp4a-Isoform waren nicht in der Lage 20-HETE in COOH-AA umzuwandeln. Cyp4a10 und Cyp4a14 zeigten keine Aktivität gegenüber 20-HETE.



**Abbildung 3-10: Schrittweise Hydroxylierung von 20-HETE zu Eicosatetraensäure.**

20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) kann schrittweise durch die Cyp4a12a über ein vicinales Diol und ein Aldehyd in Eicosatetraensäure (20-COOH-AA) umgewandelt werden. Das vicinale Diol und das Aldehyd sind kurzlebige Intermediate und nicht in der RP-HPLC nachweisbar.



**Abbildung 3-11: 20-HETE Oxidation durch Cyp4a12a.**

Das RP-HPLC Chromatogramm zeigt die Cyp4a12a katalysierte Hydroxylierung von 20-HETE zu 20-COOH-AA. Die Reaktion wurde in 100  $\mu$ l mit 10 pmol Cyp4a12a und 20  $\mu$ M 20-HETE innerhalb von 20 Minuten durchgeführt. In der Kontrollreaktion ohne Zugabe von NADPH fand keine Produktbildung statt. Die Retentionszeit von 20-COOH-AA war 13,9 und die von 20-HETE 15,5 Minuten.

Eine Analyse der AA-Umsatzrate bei 6 verschiedenen Substratkonzentrationen zwischen 2,5 und 50  $\mu$ M zeigte eine Kinetik vom Typ Michaelis-Menten. Unter diesen Bedingungen (3 Minuten Reaktionszeit, 10 pmol CYP, 100  $\mu$ l Reaktionsvolumen) war die Bildung der Hydroxylierungsprodukte linear abhängig von der Reaktionszeit und eine Sekundärproduktbildung nicht detektierbar. Die scheinbaren  $K_m$ -Werte waren 25 und 43  $\mu$ M für Cyp4a12a bzw. Cyp4a12b. Beide Enzyme erreichten  $V_{max}$ -Werte von ca. 10 nmol Produkt pro nmol CYP und Minute. Die  $V_{max}$ -Werte verdoppelten sich nahezu in Gegenwart stöchiometrischer Mengen Cyt b5 (Tabelle 3-3).

Mit Cyp4a10 und Cyp4a14 konnten AA Metabolite erst nach einer Erhöhung der Enzymkonzentration auf 500 nM und einer Verlängerung der Inkubationszeit detektiert werden (Abbildung 3-8A und Abbildung 3-8D). Die detektierten Metabolite von Cyp4a10 komigrierten mit 19-/20-HETE. Cyp4a14 war nahezu vollständig inaktiv als AA-Hydroxylase, aber produzierte geringe Mengen 11,12-EET. Bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu$ M lagen die berechneten Umsatzgeschwindigkeiten bei 0,05 (Cyp4a10) und 0,01 nmol/nmol/min (Cyp4a14) und waren damit zwei Größenordnungen kleiner als die von Cyp4a12a und Cyp4a12b katalysierten Reaktionen (Tabelle 3-3). Wegen der geringen Umsatzraten war eine detaillierte Analyse der Kinetik mit Cyp4a10 und Cyp4a14 nicht möglich.

**Tabelle 3-3: Metabolismus von Arachidonsäure durch rekombinante Cyp4a-Enzyme.**

	Km-Wert			Vmax-Wert			18-HETE	19-HETE	20-HETE	11,12-EET
	(μM)			(nmol/nmol/min)				Produktverteilung		
CYP	[+ cytb5]			[+ cytb5]				(%) <sup>a)</sup>		
4a10	nd			0,02 ± 0,01 <sup>b)</sup>			-	20 <sup>c)</sup>	80 <sup>c)</sup>	-
	[nd]			[0,05 ± 0,01] <sup>b)</sup>						
4a12a	25 ± 4			8 ± 1			-	13	87	-
	[34 ± 6]			[16 ± 2]						
4a12b	43 ± 12			10 ± 2			12	10	78	-
	[72 ± 10]			[19 ± 2]						
4a14	nd			0,01 ± 0,003 <sup>b)</sup>			-	-	-	100
	[nd]			[0,01 ± 0,001] <sup>b)</sup>						

<sup>a)</sup> Die Metabolite wurden mit RP- und NP-HPLC aufgetrennt und quantifiziert (vgl. Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9). Die Werte sind Mittelwerte von Experimenten mit mindestens drei unterschiedlichen Mikrosomenpräparationen. Der Standardfehler war kleiner als 10 % des Mittelwertes.

<sup>b)</sup> Die Aktivitäten von Cyp4a10 und Cyp4a14 sind für Substratkonzentrationen von 10  $\mu$ M angegeben, da eine detaillierte Analyse der Kinetik wegen der schwachen Aktivitäten dieser Isoformen gegenüber AA nicht möglich war. Zum Vergleich: Unter den gleichen Bedingungen liegen die Aktivitäten von Cyp4a12a bei 2,3 [3,7] und von Cyp4a12b bei 1,9 [2,3] nmol/nmol/min.

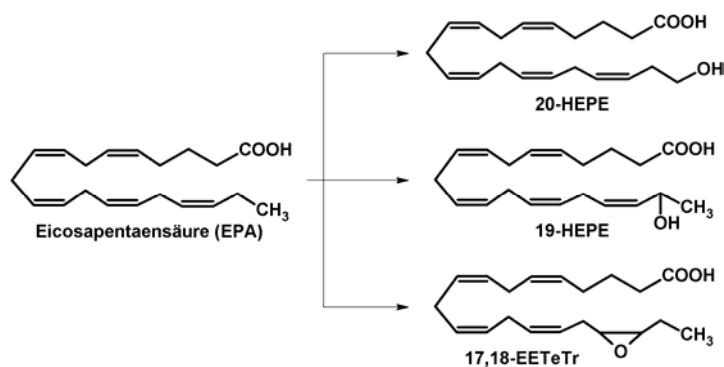
<sup>c)</sup> Geschätzte Werte aus der RP-HPLC Analyse

nd – nicht bestimmbar

### 3.1.3.3 Eicosapentaensäuremetabolismus heterolog exprimierter Cyp4a-Isoformen

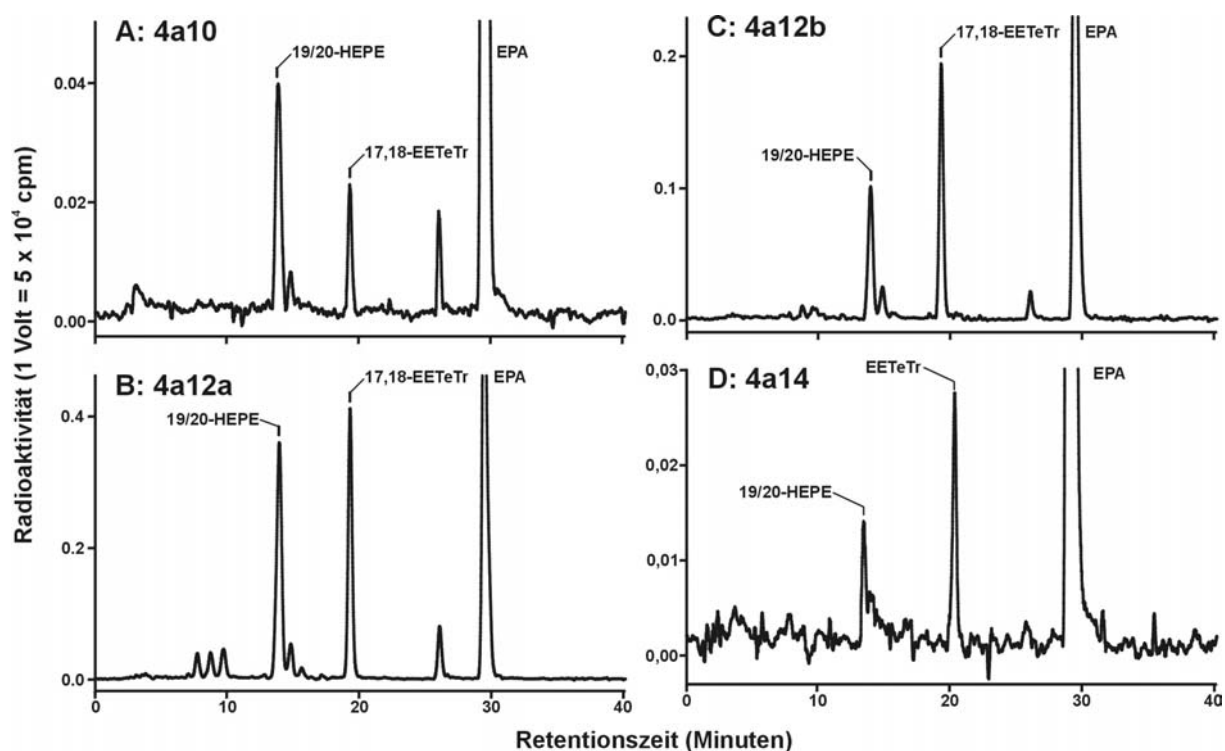
EPA wurde mit hoher katalytischer Effizienz von Cyp4a12a und Cyp4a12b metabolisiert, die die für AA sogar übertraf (Vmax- und Km-Werte für AA in Tabelle 3-3, für EPA in Tabelle 3-4). Im Vergleich dazu zeigten Cyp4a10 und Cyp4a14 nur eine schwache Kapazität EPA umzusetzen, wie schon bei AA zu erkennen war (vgl. Abbildung 3-8 und Abbildung 3-13, Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4).

Während Cyp4a12a und Cyp4a12b bei AA als reine Hydroxylasen fungierten, katalysierten beide eine Hydroxylierungs- und eine Epoxidationsreaktion bei EPA (Abbildung 3-12, vgl. Abbildung 3-8 und Abbildung 3-13). Das Verhältnis von Hydroxylase- zu Epoxygenaseaktivität war bei Cyp4a12a 1:1,5 und bei Cyp4a12b 1:2. Damit war das Epoxydationsprodukt der Hauptmetabolit der EPA-Umsätze bei beiden Isoformen. Das Epoxydationsprodukt komigrierte in RP-HPLC mit authentischem 17,18-EETeTr, das durch chemische Oxidation von EPA gebildet wurde und dessen Identität mittels GC-MS verifiziert wurde (Abbildung 3-14). Keines der anderen vier möglichen regioisomeren EPA-Epoxide, die in der RP-HPLC zwischen 21 und 23 migrierten, wurden von Cyp4a12a und Cyp4a12b gebildet.



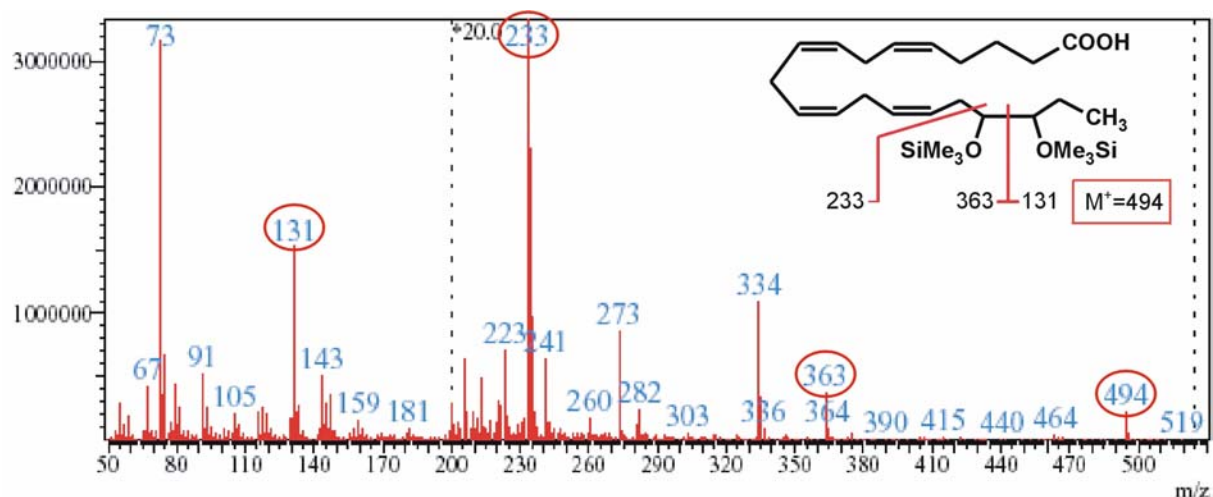
**Abbildung 3-12: Eicosapentaensäure und ihre Hydroxylierungs- und Epoxidationsprodukte.**

EPA wurde durch Cyp4a12a und Cyp4a12b zu 19-Hydroxyeicosapentaensäure (19-HEPE) und 20-Hydroxyeicosapentaensäure (20-HEPE) hydroxyliert und zu 17,18-Epoxyeicosatetraensäure (17,18-EETeTr) epoxidiert.



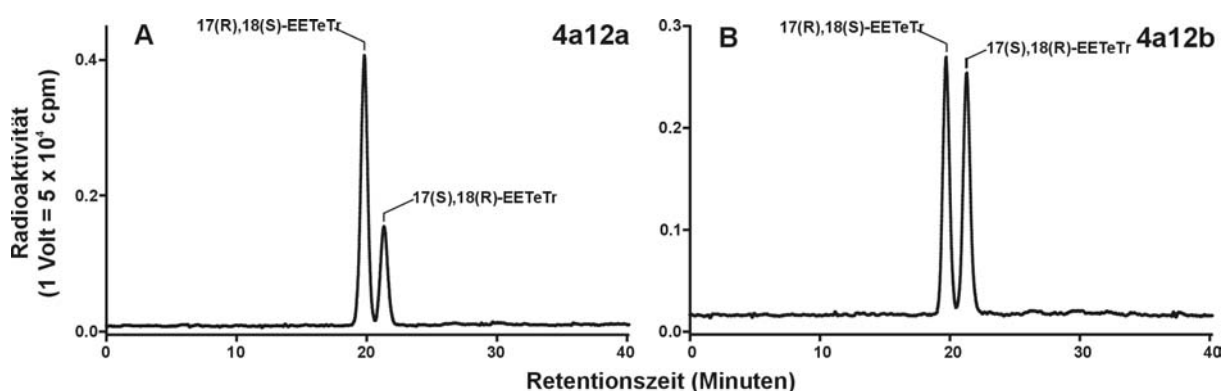
**Abbildung 3-13: Eicosapentaensäuremetabolismus rekombinanter Cyp4a-Enzyme aus der Maus.**

Dargestellt sind Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme mit dem Metabolitenprofil von Cyp4a10 (A), Cyp4a12a (B), Cyp4a12b (C) und Cyp4a14 (D). Zu beachten ist die 10-fache Vergrößerung in Abbildung 3-13A und Abbildung 3-13D gegenüber den Abbildung 3-13B und Abbildung 3-13C, um die geringen Mengen der von Cyp4a10 und Cyp4a14 gebildeten Metabolite im Vergleich zu der effizienten Produktbildung von Cyp4a12a und Cyp4a12b zeigen zu können. Die Reaktionen wurden in 400 µl mit 200 pmol Enzym (Cyp4a10 und Cyp4a14), bzw. 40 pmol Enzym (Cyp4a12a und Cyp4a12b) und 10 µM EPA innerhalb von 10 Minuten durchgeführt. Die Haupt- Hydroxylierungsprodukte eluierten bei 14,2 (19-/20-HEPE), Epoxidationsprodukte bei 19,6 (17,18-EETeTr) und 21 Minuten (14,15-EETeTre oder eines der weiteren regioisomeren EETeTrs, die alle größtenteils unaufgelöst zwischen 21 und 23 Minuten eluierten) und EPA bei 29,4 Minuten. Weitere Produkte wie der Dreifachpeak zwischen 8 und 10 Minuten bei Cyp4a12a und bei 15 Minuten mit allen Cyp4a-Isoformen, wurden NADPH und Cyp-Isoform abhängig gebildet, konnten jedoch nicht identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch um Hydrolyseprodukte oder um hydroxylierte und epoxygenierte EPA. Die quantitative Analyse der Enzymaktivitäten und der Regioselektivitäten der einzelnen Cyp4a-Isoformen gegenüber EPA sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.



**Abbildung 3-14: Identifizierung von 17,18-EETeTr anhand seines Massenspektrums.**

Um das in der RP-HPLC bei 19,6 Minuten eluierende 17,18-EETeTr mittels GC/MS trennen und detektieren zu können, wurde die Epoxy- Gruppe durch saure Hydrolyse in das Diol überführt und anschließend trimethylsilyliert, wobei 17,18-Di-Trimethylsilylether-Eicosatetraensäure entstand (17,18-Di-TMSO-EETeTr, siehe Formel in dieser Abbildung). Das Fragmentierungsmuster zeigte zum einen bei  $m/z=494$  die Masse von 17,18-Di-TMSO-EETeTr, zum anderen mit  $m/z=131$ ,  $m/z=233$  und  $m/z=363$  die prominentesten Fragmente, die bei der Ionisierung von 17,18-Di-TMSO-EETeTr entstanden (vgl. Formel). In Übereinstimmung mit einer Datenbank (GC/MS Postrun Analysis, Shimadzu) und dem Fragmentierungsmuster der authentischen Standardsubstanz konnte die Fraktion bei 19,6 Minuten in der RP-HPLC (vgl. Abbildung 3-13) als 17,18-EETeTr identifiziert werden.

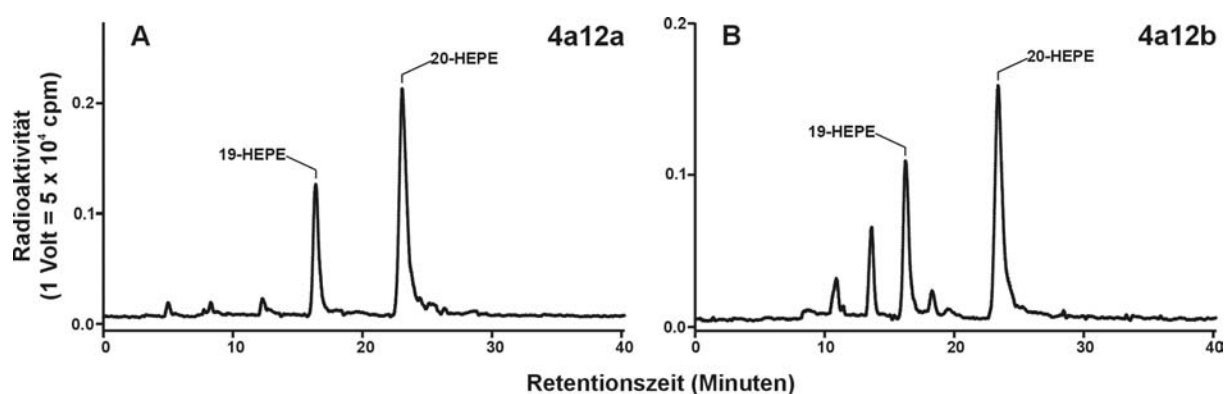


**Abbildung 3-15: Stereoselektivität der Epoxidation von Eicosapentaensäure durch Cyp4a12a und Cyp4a12b.**

Zur Analyse der Stereoselektivität bei der Bildung von 17,18-EETeTr wurde der Produktpeak bei 19,6 Minuten in der RP-HPLC gesammelt (Abbildung 3-13B und Abbildung 3-13C) und in der CP-HPLC weiter aufgelöst. Cyp4a12a bildet vorrangig 17(R),18(S)-EETeTr (Abbildung 3-15A), wohingegen Cyp4a12b keine ausgeprägte Stereoselektivität aufweist (Abbildung 3-15B). Die quantitative Analyse der Stereoselektivitäten von Cyp4a12a und Cyp4a12b bei der 17,18-EETeTr Bildung sind in Tabelle 3-4 aufgeführt. Authentische Standards wurden durch enzymatische Epoxidation von EPA mit P450BM3 [85] für 17(R),18(S)-EETeTr und mit CYP1A1 [84] für 17(S),18(R)-EETeTr hergestellt.

Mit Chiral-Phasen (CP)-HPLC konnte die Zusammensetzung der Stereoisomere des 17,18-EETeTr Peak, der aus der RP-HPLC aufgefangen wurde, aufgeklärt werden. Cyp4a12a bildete vorrangig das R,S-Enantiomer (73 % des Epoxidationsproduktes) wohingegen Cyp4a12b keine Stereoselektivität zeigte (Abbildung 3-15 und Tabelle 3-4).

Das Hydroxylaseprodukt, dessen Retentionszeit bei 14 Minuten in der RP-HPLC lag, wurde ebenfalls gesammelt und in NP-HPLC in 19- und 20-HEPE aufgetrennt (Abbildung 3-16). Beide Enzyme zeigten eine bevorzugte Bildung von 20-HEPE (Tabelle 3-4).



**Abbildung 3-16: Regioselektivität der Hydroxylierung von Eicosapentaensäure durch Cyp4a12a und Cyp4a12b.**

Zur Analyse der Regioselektivität bei der EPA Hydroxylierung wurde der Produktpeak bei 14,2 Minuten in der RP-HPLC gesammelt (Abbildung 3-13B und Abbildung 3-13C) und in der NP-HPLC weiter in 19-HEPE und 20-HEPE aufgelöst (drei oder mehr unterschiedliche Ansätze). Weitere Produkte die bei Cyp4a12b besonders ausgeprägt waren, konnten nicht identifiziert werden. Die quantitative Analyse der Regioselektivitäten von Cyp4a12a und Cyp4a12b gegenüber EPA sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.

Verglichen mit den hohen Aktivitäten der Cyp4a12-Isoformen bildeten Cyp4a10 und Cyp4a14 nur geringe Spuren an EPA Metaboliten. Hohe Enzymkonzentrationen (500 nM) und verlängerte Inkubationszeiten waren notwendig, um die gebildeten Produkte zu identifizieren. Unter diesen Bedingungen bildete Cyp4a10 19-/20-HEPE und 17,18-EETeTr (Abbildung 3-13). Das Verhältnis zwischen Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität betrug ca. 1:0,5 und unterschied sich damit deutlich von den für die Cyp4a12-Isoformen charakteristischen Verhältnissen. Die Gesamtaktivität von Cyp4a10 gegenüber EPA erreichte nur 0,03 nmol/nmol/min bei einer Substratkonzentration von 10 µM. Cyp4a14 metabolisierte EPA mit noch niedrigeren

Umsatzraten (Abbildung 3-13 und Tabelle 3-4). Die Retentionszeiten der Metabolite in der RP-HPLC deuteten mit 14 Minuten auf 19-/20-HEPE und mit 22 Minuten auf ein EPA-Epoxid hin (14,15-, 11,12-, 8,9-EETeTr eluierten gemeinsam zwischen 21 und 23 Minuten).

**Tabelle 3-4: Metabolismus von Eicosapentaensäure durch rekombinante Cyp4a-Enzyme.**

CYP	Km-Wert ( $\mu$ M)			Vmax-Wert (nmol/nmol/min)			Produktverteilung (%) <sup>a)</sup>			Stereoselektivität (%) <sup>a)</sup>		
	[+ cytb5]			[+ cytb5]			19-HEPE	20-HEPE	17,18-EETeTr	EETeTrs	17(R),18(S)- EETeTr	17(S),18(R)- EETeTr
4a10	nd			0,1	$\pm$	0,01 <sup>b)</sup>	60 <sup>c)</sup>		40	-	nd	nd
	[nd]			0,2	$\pm$	0,03 <sup>b)</sup>						
4a12a	29	$\pm$	4	14	$\pm$	1	12	32	56	-	73	27
	[33	$\pm$	2]	[29	$\pm$	1]						
4a12b	41	$\pm$	5	15	$\pm$	1	11	21	68	-	51	49
	[62	$\pm$	20]	[30	$\pm$	7]						
4a14	nd			0,02	$\pm$	0,01 <sup>b)</sup>	11		-	89	nd	nd
	[nd]			0,03	$\pm$	0,01 <sup>b)</sup>						

<sup>a)</sup> Die Metabolite wurden mit RP-, NP- bzw. CP-HPLC aufgetrennt und quantifiziert (vgl. Abbildung 3-13, Abbildung 3-15 und Abbildung 3-16). Die Werte sind Mittelwerte von Experimenten mit mindestens drei unterschiedlichen Mikrosomenpräparationen. Der Standardfehler war kleiner als 10 % des Mittelwertes.

<sup>b)</sup> Die Aktivitäten von Cyp4a10 und Cyp4a14 sind für Substratkonzentrationen von 10  $\mu$ M angegeben, da eine detaillierte Analyse der Kinetik wegen der schwachen Aktivitäten dieser Isoformen gegenüber EPA nicht möglich war. Zum Vergleich: Bei gleichen Bedingungen liegen die Aktivitäten von Cyp4a12a bei 3,6 [6,7] und von Cyp4a12b bei 3,0 [4,2] nmol/nmol/min.

<sup>c)</sup> Geschätzte Werte aus der RP-HPLC Analyse

nd – nicht bestimmbar

### 3.2 Nachweis der Expression von Cytochrom P450 4A Isoformen und 20-HETE Bildung in fünf verschiedenen Mausstämmen

#### Kapitelübersicht:

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der 20-HETE bildenden Cyp4a-Isoform in der Mausniere. Die Ergebnisse in Abschnitt 3.1 zeigen, dass nur die Isoformen Cyp4a12a und Cyp4a12b zur Bildung von 20-HETE befähigt sind. Im Folgenden wird



die Untersuchung von fünf unterschiedlichen Mausstämmen (NMRI, FVB/N, Sv129/J, BALB/c und C57BL/6) vorgestellt.

Die Expression der Cyp4a-Isoformen wurde auf verschiedenen Ebenen analysiert: auf mRNA Ebene mittels TaqMan-RT-PCR (Abschnitt 3.2.1, Methodenbeschreibung in Material und Methoden 2.1.2), auf Proteinebene mittels Westernblot (Abschnitt 3.2.2, Methodenbeschreibung in Material und Methoden 2.5.3) und auf Aktivitätsebene durch Analyse des AA Metabolismus (Abschnitt 3.2.3, Methodenbeschreibung in 2.6.2).

In den Mausstämmen NMRI, FVB/N, Sv129/J, BALB/c und C57BL/6 zeigte TaqMan-RT-PCR, dass Cyp4a10 in der Niere beider Geschlechter hoch exprimiert war, wohingegen Cyp4a12a eine hauptsächlich in männlichen und Cyp4a14 eine in weiblichen Tieren exprimierte Isoform war (Abbildung 3-17). Zudem war von den 20-HETE Synthasen nur Cyp4a12a, nicht aber Cyp4a12b signifikant in der Niere exprimiert. Zusätzlich existierten vor allem zwischen den Männchen der fünf untersuchten Stämme ausgeprägte Unterschiede in der Cyp4a12a Expression.

Die bereits auf mRNA detektierte Expression von Cyp4a12a konnte auch auf Proteinebene im Westernblot nachgewiesen werden. Die Männchen aller Stämme zeigten eine hohe, die Weibchen hingegen eine sehr niedrige Expression von Cyp4a12a. Eine Ausnahme bildeten die Weibchen der Stämme 129Sv/J und BALB/c, die eine geringe Expression von Cyp4a12a zeigten (Abbildung 3-18, ab-4a12).

Auch die AA-Hydroxylaseaktivität folgte dem geschlechts- und stammspezifischen Muster der Cyp4a12a Expression (Abbildung 3-20). Die Nierenmikrosomen aller Männchen hatten eine höhere Kapazität 20-HETE zu bilden, als die der Weibchen. Bei den Männchen gab es zwischen den Stämmen ausgeprägte Unterschiede.

Die mRNA- und Proteinexpressionen der Cyp4a-Isoformen und die mikrosomalen AA-Hydroxylaseaktivität der Niere sind ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei Cyp4a12a um die 20-HETE Synthase der Mausniere handelt.

### 3.2.1 TaqMan Analyse der mRNA Expression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere

Die unterschiedlichen Mausstämme wurden in Zusammenarbeit mit PD. Dr. Dominik Müller (MDC) untersucht. Gesamt-RNA aus der Niere wurde aus männlichen und weiblichen Mäusen fünf unterschiedlicher Stämme (NMRI, FVB/N, 129Sv/J, BALB/c und C57BL/6) isoliert. Die Expression der Cyp4a-Isoformen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Maren Wellner mittels TaqMan RT-PCR Analyse bestimmt (Abbildung 3-17).

Die **Cyp4a10** mRNA Expression war in beiden Geschlechtern hoch (Abbildung 3-17A). BALB/c, NMRI und FVB/N Weibchen zeigten eine 2- bis 4-fach höhere Expression von Cyp4a10 verglichen mit den korrespondierenden Männchen. Die Geschlechtsunterschiede in 129Sv/J und C57BL/6 waren nicht signifikant.

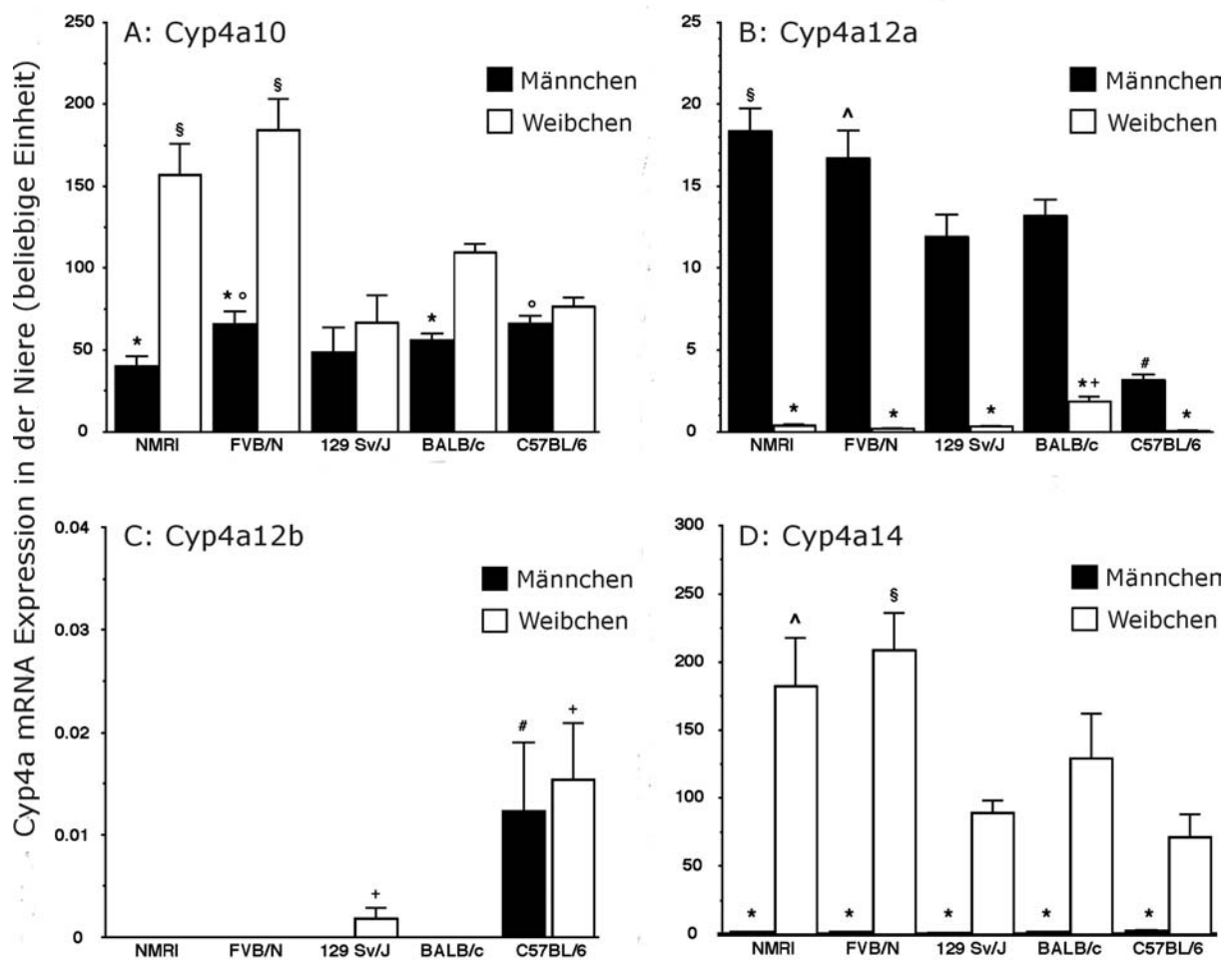
**Cyp4a12a** zeigte eine spezifische Expression in Männchen (Abbildung 3-17B). Der Cyp4a12a mRNA Gehalt in Männchen überstieg den in Weibchen 45-fach (NMRI), 88-fach (FVB/N), 40-fach (129Sv/J), 7-fach (BALB/c) und 48-fach (C57BL/6). Weibliche BALB/c Tiere hatten eine signifikant höhere Cyp4a12a mRNA Expression verglichen mit den Weibchen der anderen Stämme.

**Cyp4a12b** mRNA war nahezu nicht detektierbar in den Nieren beider Geschlechter aller Stämme. Nur in weiblichen 129Sv/J und männlichen und weiblichen C57BL/6 war die Cyp4a12b mRNA zuverlässig, jedoch an der Nachweisgrenze detektierbar (Abbildung 3-17C). Die Nierenproben der anderen Stämme zeigten nur niedrige unspezifische Signale, die nicht von der Kontrolle unterscheidbar waren. Cyp4a12b mRNA war unter den gleichen experimentellen Bedingungen problemlos in Lungenproben zu detektieren. Dies deutet auf eine anders geartete gewebespezifische Expression von Cyp4a12b hin.

**Cyp4a14** war in Weibchen aller getesteten Mausstämme hoch exprimiert. Der Cyp4a14 mRNA Spiegel in Weibchen war 20-fach (NMRI), 140-fach (FVB/N), 95-fach (129Sv/J), 84-fach (BALB/c) und 25-fach (C57BL/6) höher als in männlichen Tieren der korrespondierenden Stämme (Abbildung 3-17D).

Zusätzlich zu den Geschlechterunterschieden zeigten die TaqMan-RT-PCR Ergebnisse, dass es Stammunterschiede bei der Expression der Cyp4a-Isoformen in der Niere gibt. Zwischen den fünf untersuchten Stämmen existierten ausgeprägte

Unterschiede in der Cyp4a12a Expression (Abbildung 3-17). Die höchste Expression von Cyp4a12a lag bei NMRI Tieren vor, gefolgt von FVB/N, BALB/c und 129Sv/J. Die Expression von Cyp4a12a in der Niere männlicher C57BL/6 Tiere erreichte nur ca. 17 % des Niveaus von NMRI Tieren und war signifikant niedriger als bei den Männchen aller anderen Stämme. Im Gegensatz dazu war die Expression von Cyp4a10 und Cyp4a14 weniger variabel zwischen den Stämmen (Abbildung 3-17).

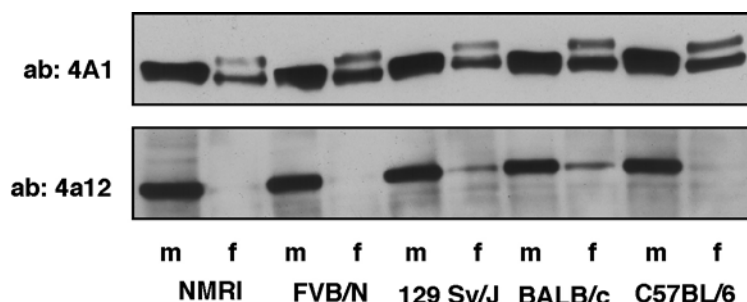


**Abbildung 3-17: Geschlechts- und stammspezifische mRNA Expression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere.**

In den Stämmen NMRI, FVB/N, 129Sv/J, BALB/c und C57BL/6 wurde die mRNA Expression von Cyp4a10 (A), Cyp4a12a (B), Cyp4a12b (C) und Cyp4a14 untersucht. Der CYP mRNA Gehalt wurde durch Taqman-RT-PCR ermittelt und auf GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 Tiere in jeder Gruppe). Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind folgendermaßen gekennzeichnet: \* gegenüber dem anderen Geschlecht des gleichen Stammes; # gegenüber den anderen männlichen Tieren; + gegenüber anderen weiblichen Tieren; § gegenüber 129Sv/J, BALB/c und C57BL/6; ^ gegenüber 129Sv/J und C57BL/6; ° gegenüber NMRI.

### 3.2.2 Westernblot Analyse der Proteinexpression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere

Für die Analyse der geschlechts- und stammspezifischen Unterschiede auf Proteinebene wurden die Proteine der Nierenmikrosomen männlicher und weiblicher Tiere der fünf Mausstämme in einem SDS Gel elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Cyp4a-Isoformen in einer Immunreaktion mit den in Abschnitt 3.1.2.2 vorgestellten Antikörpern nachgewiesen. Die Westernblot Analyse der Mausnieren Mikrosomen bestätigte die Geschlechtsunterschiede der Cyp4a12a mRNA Expression (Abbildung 3-18). Ab-4a12 zeigte eine einzige starke Bande bei männlichen, aber nahezu keine Reaktion bei weiblichen Nierenmikrosomen, mit Ausnahme einer sehr schwachen, aber reproduzierbaren Cyp4a12 Proteinexpression bei weiblichen 129Sv/J und BALB/c Tieren (Abbildung 3-18).



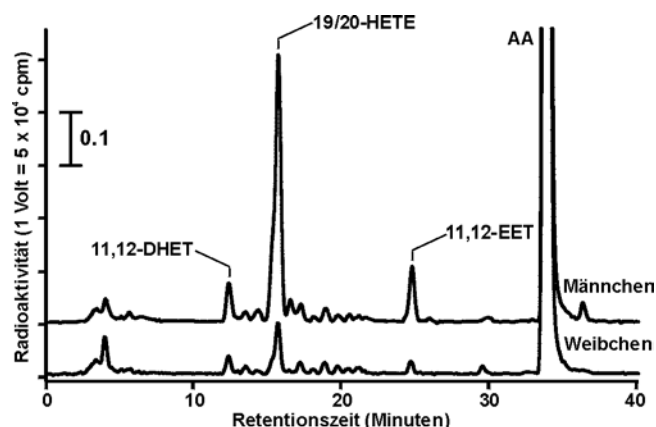
**Abbildung 3-18: Geschlechts- und stammspezifische Proteinexpression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere.**

Für den Immunnachweis der Westernblotanalyse der geschlechts- (m: Männchen, f: Weibchen) und stammspezifischen (NMRI, FVB/N, SV129/J, BALB/c und C57BL/6) Cyp4a Protein Expression in Nierenmikrosomen wurden die Primären Antikörper gegen CYP4A1 (ab-4A1) und Cyp4a12 (ab-4a12) verwendet (vgl. Abbildung 3-3). In den männlichen Tieren aller Stämme war die bereits auf mRNA detektierte (Abbildung 3-17) hohe Expression von Cyp4a12a auch auf Proteinebene zu erkennen (ab-4a12). Bei den weiblichen Tieren war Cyp4a12a nur bei 129Sv/J und BALB/c schwach aber deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 3-17). Ab-4A1 reagierte bei den Nierenmikrosomen der Weibchen mit zwei Proteinen, deren scheinbares Molekulargewicht wie das der Cyp4a-Isoformen der Maus bei 58 kDa, bzw. etwas darüber lag (vgl. Abbildung 3-3). Eine Zuordnung der Banden zu einer Isoform war nicht möglich.

### 3.2.3 Geschlechts- und stammspezifischer Arachidonsäuremetabolismus in Nierenmikrosomen

Zur Bestimmung des renalen mikrosomalen AA Metabolismus wurde [ $1\text{-C}^{14}$ ]-markierte AA mit Nierenmikrosomen inkubiert (vgl. Abschnitt 2.6.2 in Material und Methoden). Nach Beendigung der Reaktion und Extraktion erfolgte die Trennung der Metabolite mittels RP-HPLC und ihre quantitative Analyse durch Integration der Peakflächen mit der Software Class-VP (Shimadzu).

Die Nierenmikrosomen aller getesteten Mausstämme zeigten sowohl AA-Hydroxylase- als auch AA-Epoxygenase Aktivität. Die gebildeten Hauptprodukte waren 19-/20-HETE und 11,12-EET (Abbildung 3-19). Das Epoxygenaseprodukt wurde teilweise weiter in die korrespondierende Dihydroxy- Verbindung (11,12-DHET) umgewandelt, vermutlich durch die in der mikrosomalen Fraktion verbliebene lösliche Epoxidhydrolase (sEH).



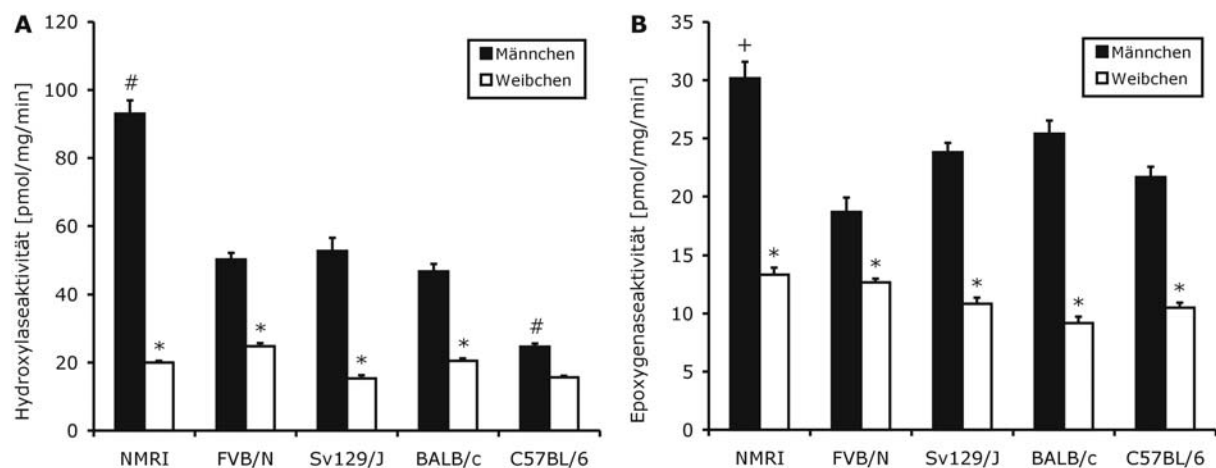
**Abbildung 3-19: Arachidonsäuremetabolismus männlicher und weiblicher NMRI Mäuse.**

In dem repräsentativen RP-HPLC Chromatogramm sind die Metabolite dargestellt, die bei Umsetzungen (400  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen) von AA (40  $\mu\text{M}$ ) durch Nierenmikrosomen (320  $\mu\text{g}$  Protein) männlicher und weiblicher NMRI Mäuse innerhalb von 20 Minuten gebildet wurden. Hauptprodukte sind 11,12-DHET (13,5), 19-/20-HETE (15,5) und 11,12-EET (24,7 Minuten). Unter den gleichen Reaktionsbedingungen sieht man die im Vergleich zu den Weibchen deutlich größere Kapazität der Nierenmikrosomen männlicher Tiere 19-/20-HETE und EETs zu bilden.

Die Kapazität zur Produktion von 19-/20-HETE unterschied sich signifikant zwischen männlichen und weiblichen Tieren aller Stämme außer C57BL/6 (Abbildung 3-20A). Die Nierenmikrosomen der weiblichen Mäuse hatten niedrige AA-Hydroxylase Aktivitäten zwischen 15 und 25 pmol/min/ $\mu\text{g}$ . Männliche Tiere wiesen eine 3- bis 5-fach höhere Aktivität auf als die weiblichen Tiere des gleichen Stammes. Die

Geschlechtsunterschiede waren in NMRI Mäusen am stärksten ausgeprägt, in denen die männlichen Tiere eine AA-Hydroxylase Aktivität von  $93 \pm 4$  pmol/min/μg erreichten, die weiblichen jedoch nur  $20 \pm 0,5$  pmol/min/μg. Keine signifikanten Geschlechtsunterschiede konnten bei der 20-HETE Bildung in den Nierenmikrosomen von C57BL/6 Mäusen festgestellt werden ( $25 \pm 1$  pmol/min/μg in Männchen gegenüber  $16 \pm 1$  pmol/min/μg in Weibchen).

Deutliche Geschlechtsunterschiede waren auch in der AA-Epoxygenase (Abbildung 3-20B) der Nierenmikrosomen zu erkennen. Im Gegensatz zu den starken Unterschieden in der 20-HETE Produktion zwischen den männlichen Tieren der Stämme waren die stammspezifischen Unterschiede in der EET Bildung weniger stark ausgeprägt.



**Abbildung 3-20: Geschlechts- und stammspezifische Unterschiede in Arachidonsäure Hydroxylase- (A) und Epoxygenaseaktivität (B) von Mausnierenmikrosomen.**

Die AA-Hydroxylase- (A) und Epoxygenaseaktivität (B) männlicher und weiblicher Tiere der Stämme NMRI, FVB/N, SV129/J, BALB/c und C57BL/6 wurden in Standardreaktionen (100 μl) mit 40 μM AA, 80 μg mikrosomalem Protein und 20 Minuten Inkubationszeit ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 pro Gruppe). Alle Männchen zeigten eine signifikant höhere Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität als die Weibchen (\*,  $P < 0,05$ ). Eine Ausnahme bildet die Hydroxylaseaktivität der Gruppe der männlichen C57BL/6 Tiere, die sich nicht durch eine höhere Aktivität von den Weibchen, jedoch durch eine geringere Aktivität von den NMRI Männchen signifikant unterschied (#,  $p < 0,05$ ).

### **3.3 Induktion der renalen 20-HETE Produktion durch Androgenbehandlung**

#### **Kapitelübersicht:**

In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass die Cyp4a-Isoformen geschlechtsspezifisch exprimiert werden. Zudem zeigten Nakagawa et al. [17], dass die Expression von CYP4A8 und die Bildung von 20-HETE in den Nieren von SD Ratten durch Androgene induzierbar sind (vgl. 1.2.5 Einleitung). Im Folgenden wird die Induzierbarkeit der 20-HETE Bildung in der Niere durch eine Androgenbehandlung in Mäusen und in weiblichen Ratten untersucht.

Dazu wurden männliche NMRI und C57BL/6 Mäuse für 10 Tage und weibliche Lewisratten für 14 Tage mit 5 $\alpha$ -DHT behandelt. Bei den Mäusen wurde die renale Expression von Cyp4a12a auf mRNA- (Taq-Man-RT-PCR, Abschnitt 2.1.2 in Material und Methoden), Protein-(Westernblot, Abschnitt 2.5.3 in Material und Methoden) und Aktivitätsebene (mikrosomaler AA-Metabolismus, Abschnitt 2.6.2 in Material und Methoden) analysiert. Bei den Lewisratten wurde die AA-Hydroxylaseaktivität der Niere untersucht (Abschnitt 2.6.2 in Material und Methoden).

Kapitel 3.3.1 beschreibt die signifikante Induktion von Cyp4a12a in männlichen C57BL/6 und NMRI Mäusen durch die Androgenbehandlung. Diese konnte auf mRNA, Protein und Enzymaktivitätsebene nachgewiesen werden (Abbildung 3-21). In C57BL/6 führte diese Behandlung zu einer Cyp4a12a Expression und 20-HETE Produktion ähnlich wie bei NMRI Männchen unter Basalbedingungen.

Die Untersuchung der Induktion der 20-HETE Bildung in Lewisratten ist in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die Nierenmikrosomen unbehandelter männlicher und weiblicher Ratten unterschieden sich nicht in ihrer Kapazität, EETs und 20-HETE zu bilden. Durch 5 $\alpha$ -DHT wurde die 20-HETE Produktion in weiblichen Lewisratten signifikant induziert.

#### **3.3.1 Androgenbehandlung männlicher NMRI und C57BL/6 Mäuse**

In Abschnitt 3.1 und 3.2 wurde dargelegt, dass die 20-HETE bildende Cyp4a-Isoform in der Mausniere Cyp4a12a ist. Im Folgenden wird die Induktion der 20-HETE Bildung und damit der Expression von Cyp4a12a durch 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron in

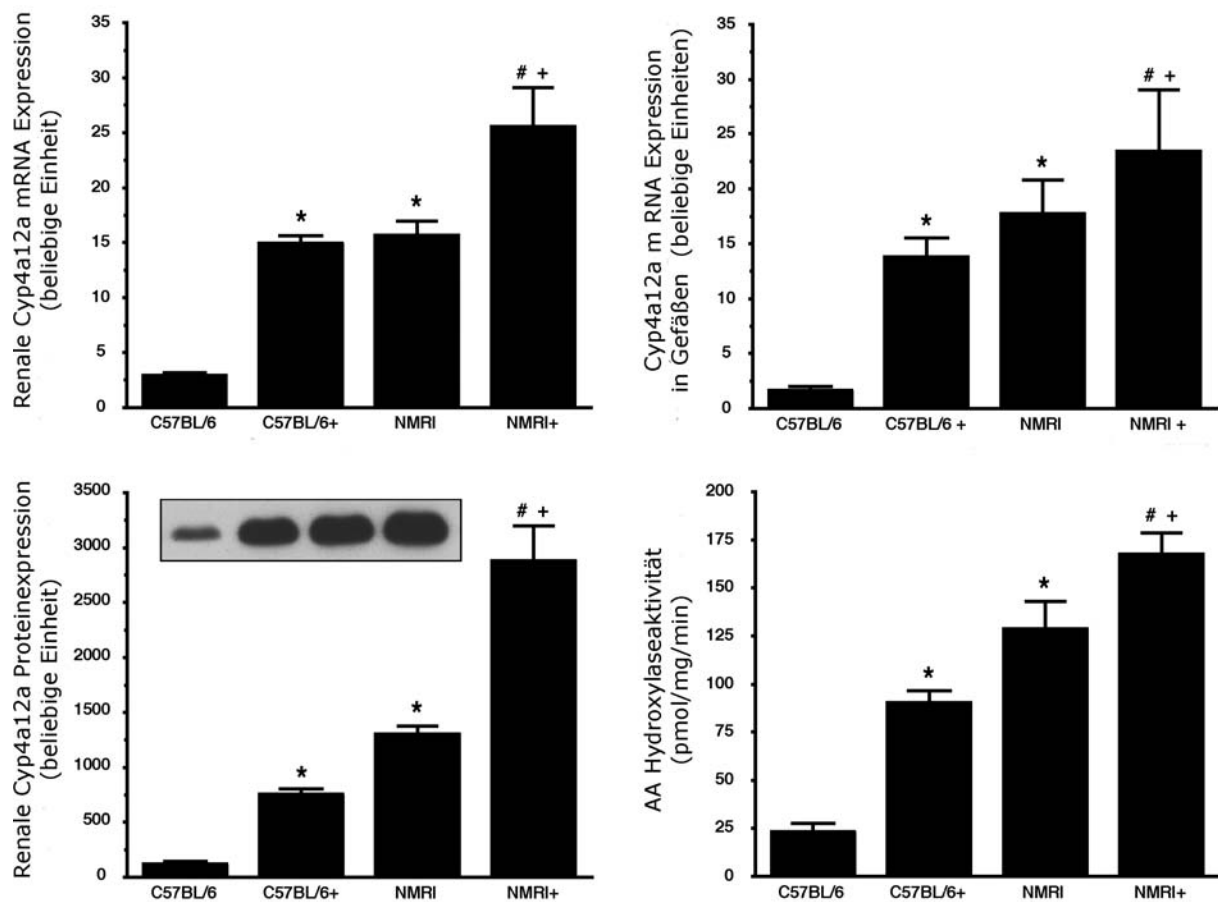
männlichen Tieren der Mausstämme NMRI und C57BL/6 untersucht. Dies fand in Zusammenarbeit mit PD. Dr. Dominik Müller (MDC) statt.

Die Androgenbehandlung induzierte die mRNA Expression von Cyp4a12a in der Niere mehr als 4-fach in C57BL/6 und 1,4-fach in NMRI verglichen mit der korrespondierenden unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3-21A). Der Androgen-induzierte Anstieg der Cyp4a12a mRNA Expression konnte auch in den interlobularen Arteriolen der Nieren der gleichen Tiergruppen gemessen werden (Abbildung 3-21B).

Eine Analyse der Cyp4a12 Expression auf Proteinebene mit anti-Cyp4a12 zeigte einen signifikant höheren Cyp4a12 Proteingehalt in männlichen NMRI als in männlichen C57BL/6. 5 $\alpha$ -DHT induzierte den Cyp4a12 Proteingehalt in C57BL/6 auf 600 % der unbehandelten Kontrolle, in einem geringeren Ausmaß auch in NMRI (auf 200 % der unbehandelten Kontrolle; Abbildung 3-21C).

Die AA-Hydroxylase Aktivität der Nierenmikrosomen lag bei unbehandelten Tieren bei  $23 \pm 4$  pmol/min/ $\mu$ g in C57BL/6 und  $128 \pm 14$  pmol/min/ $\mu$ g in NMRI. Eine Behandlung mit 5 $\alpha$ -DHT erhöhte die Aktivität auf  $90 \pm 7$  pmol/min/ $\mu$ g in C57BL/6 und auf  $167 \pm 11$  pmol/min/ $\mu$ g in NMRI Männchen (Abbildung 3-21D).





**Abbildung 3-21: Einfluss von 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron auf die Cyp4a12a Expression und die mikrosomale 20-HETE Bildung in der Niere männlicher NMRI und C57B/6 Mäuse.**

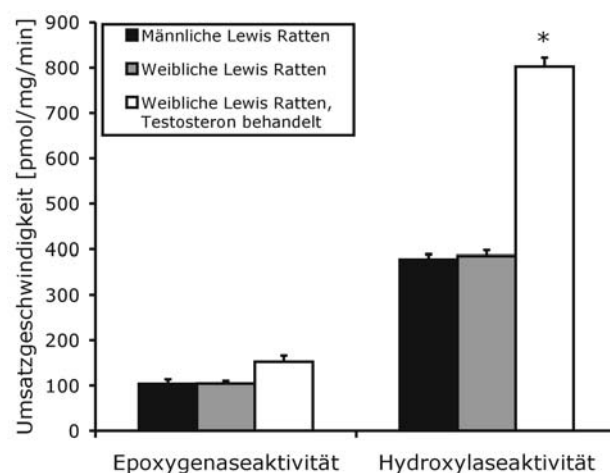
Der mRNA Gehalt der Gesamtnieren (A) und der interlobularen Arteriolen (B) aus NMRI und C57BL/6 und 5 $\alpha$ -DHT behandelten NMRI (NMRI+) und C57BL/6 Männchen (C57BL/6+) wurde mittels Taqman-RT-PCR ermittelt. Mikrosomales Cyp4a12a Protein aus der Gesamtniere wurde mit dem peptidspezifischen Antikörper gegen Cyp4a12a nachgewiesen (C). Die renale AA-Hydroxylaseaktivität wurde in einer Standardreaktion (100  $\mu$ l) mit 40  $\mu$ M AA, 80  $\mu$ g mikrosomalem Protein und einer 20-minütigen Inkubationszeit ermittelt (D). Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). mRNA Expression, Proteinexpression und Hydroxylaseaktivität waren bei unbehandelten Tieren in NMRI höher als in C57BL/6. 5 $\alpha$ -DHT induzierte Cyp4a12a signifikant auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene in beiden Stämmen. Die Expression von Cyp4a12a und die AA-Hydroxylaseaktivität von 5 $\alpha$ -DHT behandelten C57BL/6 erreichten nahezu die unbehandelten NMRI. Die signifikanten Unterschiede (p<0,05) sind folgendermaßen gekennzeichnet: \* gegenüber unbehandelten C57BL/6, # gegenüber unbehandelten NMRI und + gegenüber behandelten C57BL/6.

### 3.3.2 Androgenbehandlung weiblicher Lewisratten

Die Versuche an Lewisratten fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Hoff und Prof. Dr. Duska Dragun (Nephrologie, Campus Virchow Klinikum, Charité Berlin) statt. In der Ratte existieren vier CYP4A-Isoformen: CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3 und CYP4A8. Ihre Expression ist ebenso wie die der Cyp4a-Isoformen der Maus gewebs-

und geschlechtsspezifisch. Im Folgenden wird die Induktion der 20-HETE Bildung durch 5 $\alpha$ -DHT in weiblichen Lewisratten untersucht.

Weibliche Lewisratten wurden für 14 Tage mit 5 $\alpha$ -DHT behandelt (vgl. Abschnitt 2.8.4). Zur Analyse der mikrosomalen AA-Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität der Niere wurden 100  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]-markierte Arachidonsäure mit 80  $\mu$ g Protein für 20 Minuten umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion und Extraktion der Metabolite erfolgten Trennung mittels RP-HPLC und quantitative Analyse durch Integration der Peakflächen mit der Software Class-VP (Shimadzu).



**Abbildung 3-22: Einfluss von 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron auf die mikrosomale 20-HETE Bildung in der Niere weiblicher Lewisratten.**

Die AA-Hydroxylaseaktivität wurde in einer Standardreaktion (100  $\mu$ l) mit 100  $\mu$ M AA, 80  $\mu$ g mikrosomalem Protein und einer 20-minütigen Inkubationszeit ermittelt. Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). Die Hydroxylaseaktivität war bei unbehandelten Tieren in Männchen und Weibchen identisch. 5 $\alpha$ -DHT induzierte die Hydroxylaseaktivität signifikant (\*, p<0,001).

Die AA-Hydroxylase Aktivität der Nierenmikrosomen lag bei unbehandelten Tieren bei 378  $\pm$  11 pmol/min/ $\mu$ g in Männchen und 385  $\pm$  12 pmol/min/ $\mu$ g in Weibchen. Eine Behandlung mit 5 $\alpha$ -DHT verdoppelte die Hydroxylaseaktivität in Weibchen auf 802  $\pm$  20 pmol/min/ $\mu$ g. Die AA-Epoxygenaseaktivität lag bei unbehandelten Männchen bei 103  $\pm$  10 pmol/min/ $\mu$ g, bei unbehandelten Weibchen bei 104  $\pm$  6 pmol/min/ $\mu$ g. 5 $\alpha$ -DHT induzierte die AA-Epoxygenaseaktivität in den Weibchen 1,5-fach auf 152  $\pm$  14 pmol/min/ $\mu$ g (Abbildung 3-22).

### 3.4 Gewebespezifische Verstärkung der 20-HETE Bildung durch Überexpression von Cyp4a12a in C57BL/6 Mäusen

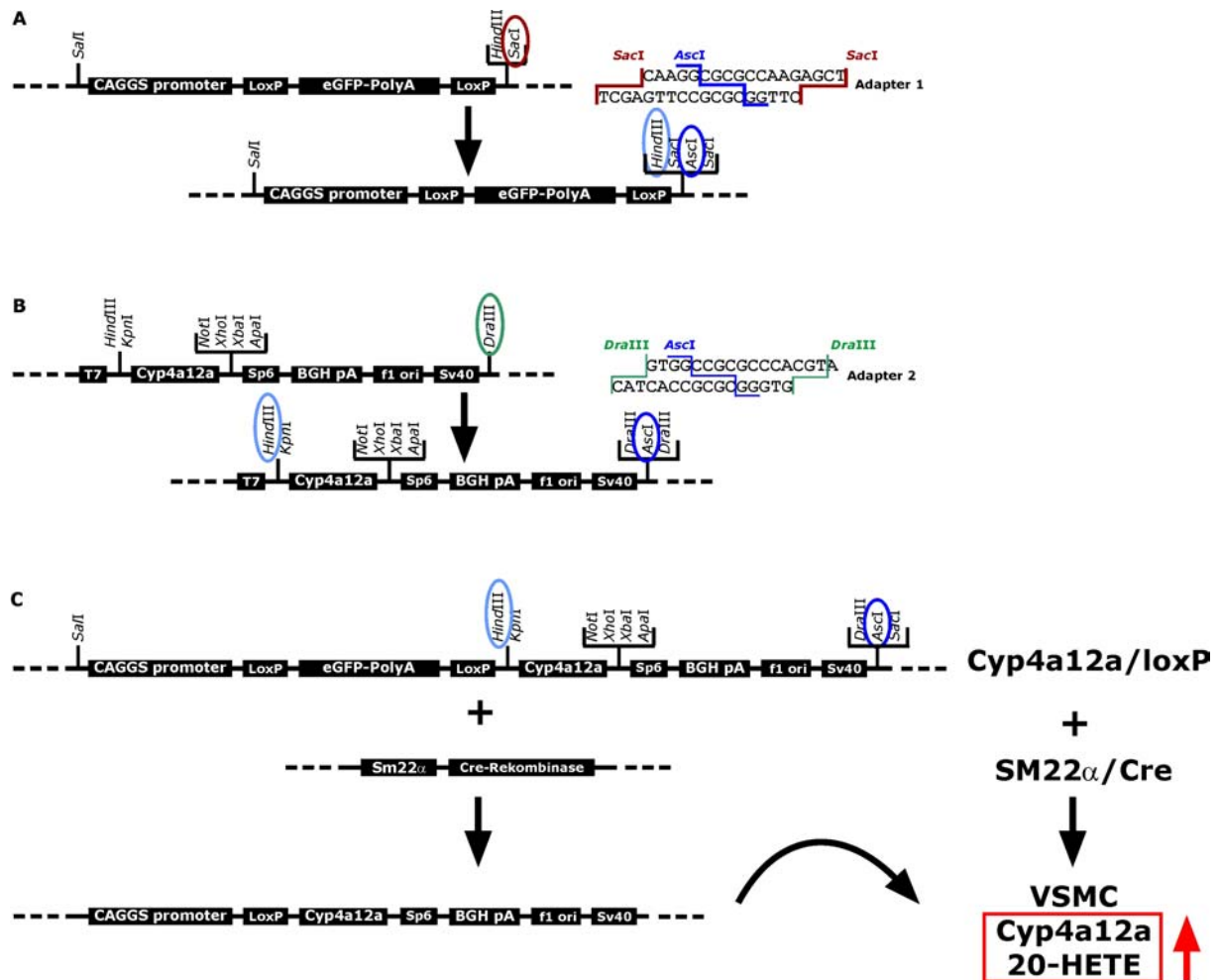
#### Kapitelübersicht:

Um die physiologische Bedeutung von 20-HETE in unterschiedlichen Geweben *in vivo* untersuchen zu können, ist eine gewebespezifische Überexpression der 20-HETE Synthase Cyp4a12a sinnvoll. Eine Möglichkeit ist, dies in der Maus mit Hilfe des Cre/loxP Systems zu verwirklichen.

Dazu wurde Cyp4a12a in ein loxP Konstrukt kloniert (vgl. Material und Methoden 2.1.5 und Abbildung 3-23), das zur Generierung eines Cyp4a12a transgenen Tieres verwendet wurde. Die entstandene Mauslinie wurde mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Promoters für SM22 $\alpha$  exprimieren. Die Expression von Cyp4a12a (Taq-Man-RT-PCR, Westernblot, Immunhistochemie) in den Nachkommen dieser Verpaarung wurden im Folgenden untersucht.

Die gewebespezifische Überexpression von Cyp4a12a mit Hilfe des Promoters für SM22 $\alpha$  führte zu einer Überexpression von Cyp4a12a im Herzen und in den Gefäßen. Dies konnte an Herzen und Aorten mittels Taqman-RT-PCR auf mRNA Ebene (Kapitel 3.4.1, Abbildung 3-24) und mittels Westernblot (Kapitel 3.4.2, Abbildung 3-25) auf Proteinebene nachgewiesen werden. Immunhistochemie an Herzschnitten zeigte eine Überexpression von Cyp4a12 in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen der Vaskulatur (VSMC; Kapitel 3.4.3, Abbildung 3-26).

Um die Rolle von 20-HETE im kardiovaskulären System *in vivo* untersuchen zu können, wurden C57BL/6 Mäuse in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Bader und Natascha Alelina (MDC) gentechnisch verändert (vgl. 2.1.5 und 2.8.3). Diese Mäuse tragen ein loxP Konstrukt zur Überexpression von Cyp4a12a. Dazu wurden in den Vektor pBS-CX1-loxP-eGFP-loxP mit Hilfe des Adapters 1 (Abbildung 3-23A) und in Cyp4a12a/pCDNA3 mit Hilfe des Adapters-2 (Abbildung 3-23B) eine zusätzliche Schnittstelle (Ascl) eingefügt. Die eingefügte Schnittstelle Ascl ermöglichte zusammen mit *Hind*III eine Umklonierung von Cyp4a12a mit einem PolyA-tail in den Vektor pBS-CX1-loxP-eGFP-loxP hinter dem geflochtenen eGFP.



**Abbildung 3-23: Schematische Darstellung der Cre/loxP Kreuzung mit ursprünglichen und resultierenden Konstrukten.**

(A): Ausschnitt aus dem pBS-CX1-loxP-eGFP-loxP Vektor, in den mit Hilfe des Adapters 1 eine Ascl Schnittstelle eingefügt wurde.

(B): Cyp4a12a-polyA -Ausschnitt aus dem Cyp4a12a/pcDNA3 Vektor, in den mit Hilfe des Adapters 2 eine Ascl Schnittstelle eingefügt wurde.

(C): Produkt der Ligation des pBS-CX1-loxP-eGFP-loxP Vektor (mit Adapter 1) mit Cyp4a12a-polyA (mit Adapter 2) nach Restriktion mit HindIII und Ascl. Dieses Konstrukt wurde zur gentechnischen Veränderung von Mäusen verwendet (Cyp4a12a/loxP). Eine Kreuzung der Cyp4a12a/loxP-Mäuse mit SM22α/Cre-Mäusen führt dazu, dass die in VSMC exprimierte Cre-Rekombinase an den loxP Stellen das eGFP ausschneidet, dies führt zu einer Überexpression von Cyp4a12a und somit 20-HETE in den VSMC.

Mit diesem Konstrukt wurden gentechnisch veränderte Mäuse (Cyp4a12a/loxP) hergestellt. Bei Kreuzung dieser Cyp4a12a/loxP Mäuse mit Mäusen, die eine gewebespezifische Expression der Cre-Rekombinase in VSMC aufweisen (hier mit Hilfe des SM22α Promoters; SM22α/Cre), erhält man Tiere in denen gewebespezifisch das gefloxt eGFP ausgeschnitten wurde (Abbildung 3-23C).

Diese Tiere überexprimieren Cyp4a12a und damit 20-HETE in VSMC. Bei dem verwendeten CAAGS Promotor handelt es sich um einen modifizierten CMV-Promoter [86, 87].

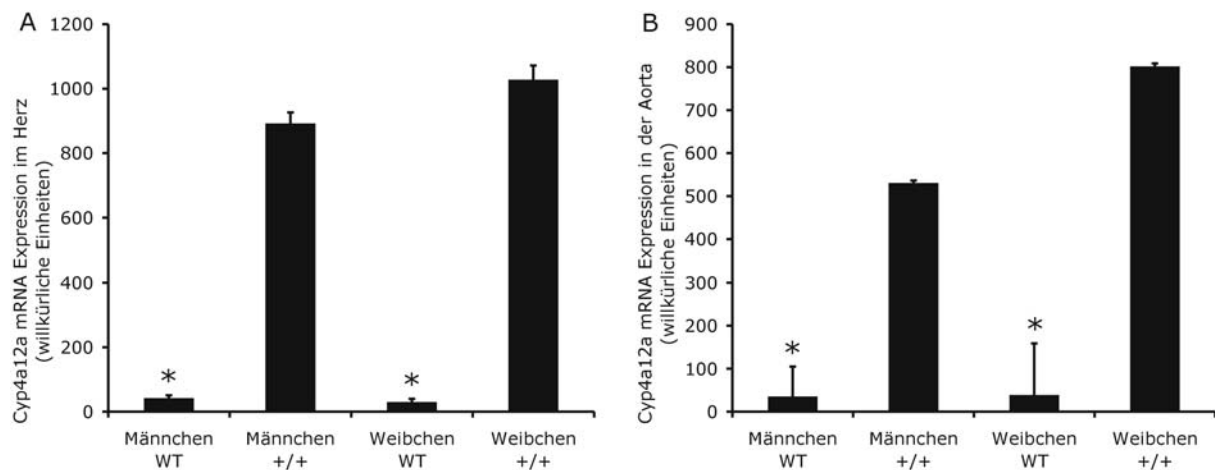
Der genetischen Status der SM22 $\alpha$ /Cre-, der Cyp4a12a/loxP- und der Kreuzung dieser beiden Mauslinien wurde durch PCR genomischer DNA überprüft (vgl. 2.1.6). In einer anschließenden Gelelektrophorese zeigten Mäuse mit einer Expression des SM22 $\alpha$ /Cre-Konstruktes eine Bande mit einer Größe von 340 bp, Mäuse mit einer Expression des Cyp4a12a/loxP-Konstruktes eine Bande von 511 bp. Mäuse aus der Kreuzung (SM22 $\alpha$ /Cre x Cyp4a12a/loxP) trugen beide, nur eines der beiden oder keines der Konstrukte.

Im Folgenden werden erste Ergebnisse einer Kreuzung zwischen Cyp4a12a/loxP- und SM22 $\alpha$ /Cre-Mäusen vorgestellt.

#### 3.4.1 Taqman-RT-PCR Analyse der mRNA Expression in Herz und Aorta

Die Gesamt-RNA aus Herz und Aorta von männlichen und weiblichen Tieren (WT und +/+) wurde isoliert und die Expression von Cyp4a12a mittels TaqMan-RT-PCR Analyse bestimmt.

Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen C57BL/6 WT Tieren lag eine geringe basale Expression von Cyp4a12a im Herzen und in der Aorta vor. Die Überexpression von Cyp4a12a verstärkte die mRNA im Herzen bei den Männchen 22-fach und bei den Weibchen 37-fach (Abbildung 3-24A). In der Aorta lag die Überexpression bei den Männchen 16- und bei den Weibchen 21-fach über dem Wert der WT (Abbildung 3-24B).



**Abbildung 3-24: Taqman-RT-PCR Analyse der Cyp4a12a Expression in Herz (A) und Aorta (B) männlicher und weiblicher C57BL/6 Mäuse mit (+/+) und ohne Überexpression (WT) von Cyp4a12a.**

Der Cyp4a12a mRNA Gehalt wurde durch Taqman-RT-PCR ermittelt und auf GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Herz: Männchen WT n=7; Weibchen +/+ n=8, ansonsten n=6 Tiere/Gruppe; Aorta: Männchen +/+ n=4, ansonsten n=5 Tiere/Gruppe). Die Unterschiede zwischen WT und +/+ waren signifikant (\*,  $p < 0,001$ ).

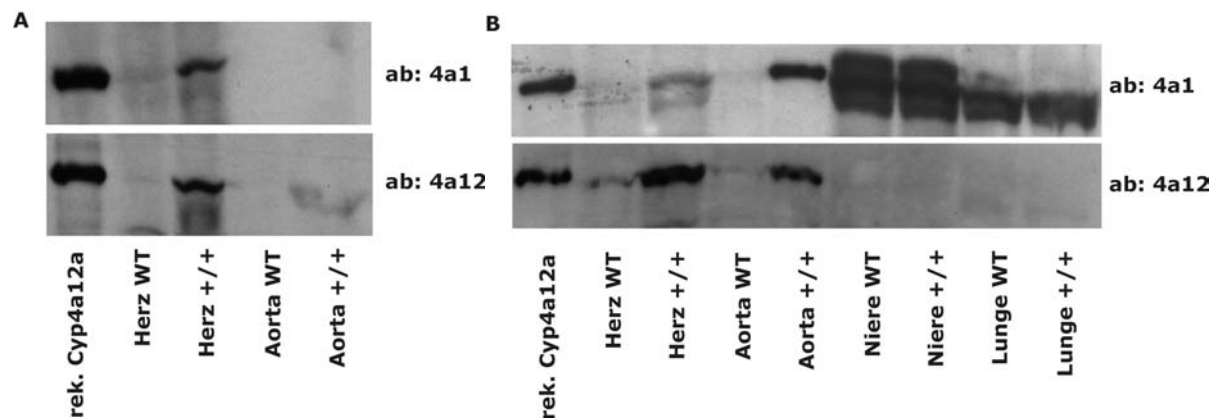
Bei den hier vorgestellten Ergebnissen wurde nicht zwischen den verschiedenen loxP Foundern unterschieden, da diese den gleichen genetischen Hintergrund besitzen (C57BL/6) und das gleiche Konstrukt exprimieren (siehe oben). Ebenso wurde nicht zwischen den verschiedenen Kontrollgruppen (Cre/loxP (-/-); Cre/loxP (-/+); Cre/loxP (+/-)) unterschieden; diese wurden unter Wildtyp (WT) zusammengefasst. Die Bezeichnung der Tiere mit einer Cyp4a12a Überexpression lautet +/+. Bei quantitativen Untersuchungen (Taqman-RT-PCR) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Foundern und den Kontrollgruppen beobachtet.

### 3.4.2 Westernblot Analyse der Proteinexpression in Herz, Aorta, Lunge und Niere

Für die Analyse der Cyp4a12a Überexpression auf Proteinebene wurden Herz-, Aorta-, Lungen- und Nierenhomogenate in einem SDS Gel elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und Cyp4a12a in einer Immunreaktion mit peptidspezifischen Antikörpern gegen Cyp4a12a (vgl. Abschnitt 2.5.1) nachgewiesen.

Die Westernblot Analyse der Herz- und Aortahomogenate zeigte anhand einer einzigen klaren Bande eine Überexpression von Cyp4a12a sowohl in männlichen als auch in weiblichen +/+ gegenüber dem jeweiligen Kontrollstamm (WT, Abbildung 3-25A und B). Dies bestätigt die in Abschnitt 3.4.1 vorgestellten Taqman-RT-PCR Ergebnisse. In den WT Mäusen beider Geschlechter ließ sich auf Proteinebene nur eine leichte Expression einer Cyp4a12-Isoform in Herz und Aorta nachweisen (Abbildung 3-25A und B).

Weder in der Niere, noch in der Lunge weiblicher WT und +/+ Mäuse gab es eine Immunreaktion mit ab-4a12 (Abbildung 3-25B, ab-4a12). Ab-4A1 detektierte aber in den Homogenaten beider Organe die Anwesenheit anderer Cyp4a-Isoformen, mit dem scheinbares Molekulargewicht zwischen 55 und 60 kDa. Diese Banden konnten jedoch keiner Isoform zugeordnet werden (Abbildung 3-25B, ab-4A1).



**Abbildung 3-25: Westernblot Analyse der Überexpression von Cyp4a12a in männlichen (A) und weiblichen (B) Tieren.**

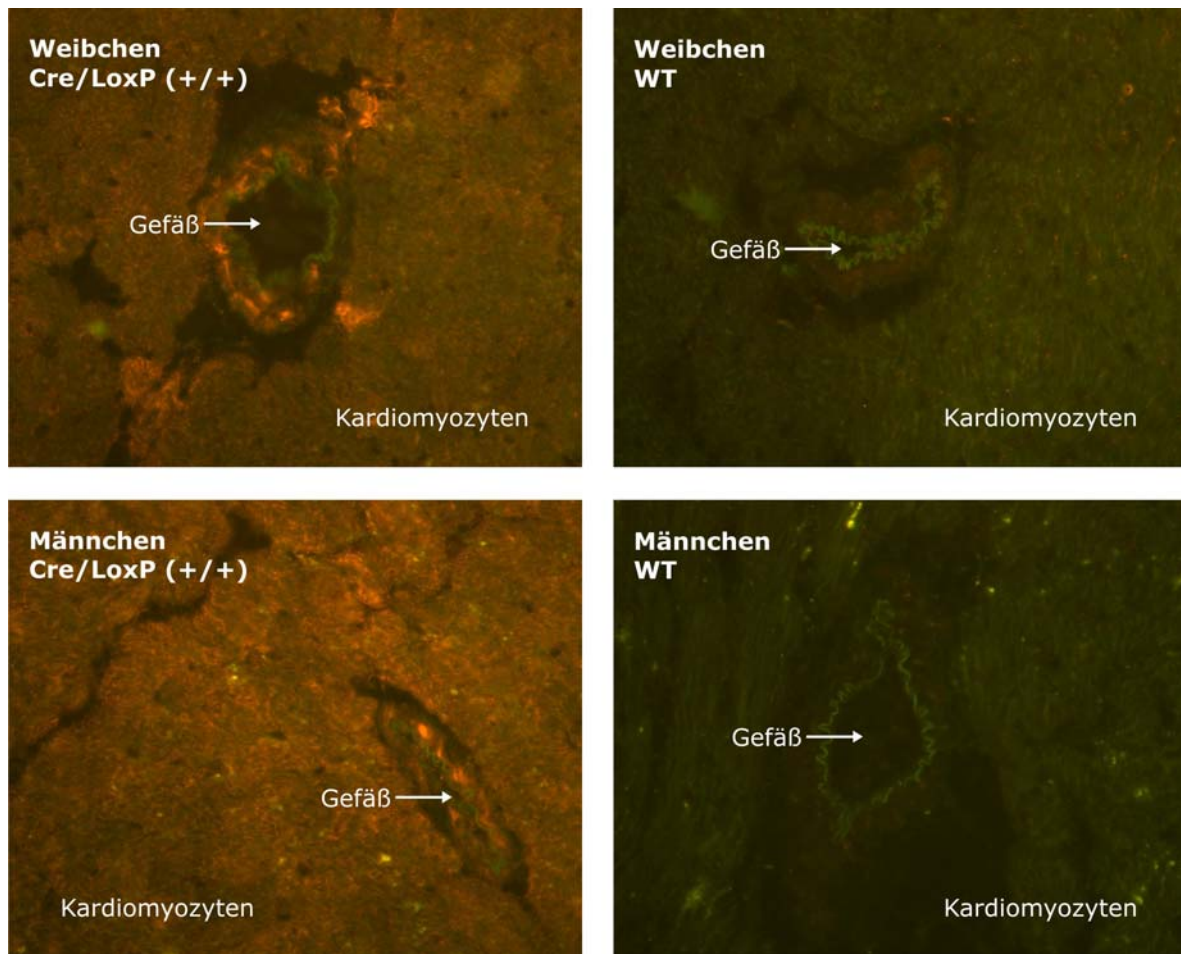
Für den Immunnachweis der Westernblotanalyse der Überexpression von Cyp4a Protein in beiden Geschlechtern (m: Männchen, f: Weibchen) genetisch modifizierter C57BL/6 (+/+) und Wildtyp (WT) Mäuse wurden die primären Antikörper gegen CYP4A1 (ab-4A1) und Cyp4a12 (ab-4a12) verwendet (vgl. Abschnitt 3.1.2.2, 3.2.23.4.2 und 3.3.1). In den Homogenaten männlicher (A) und weiblicher (B) Tiere konnte die in Herz und Aorta bereits auf mRNA Ebene detektierte Überexpression von Cyp4a12a bestätigt werden. In Niere und Lunge weiblicher Mäuse konnte kein Cyp4a12 Protein detektiert werden. Mit ab-4A1 konnte jedoch die Expression anderer Cyp4a-Isoformen nachgewiesen werden.

### 3.4.3 Immunhistochemie an Herzschnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen der Cyp4a12a Überexpression in den Mausherzen wurden frisch entnommene Herzen in physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In Kryoschnitten der Herzen wurde Cyp4a12a mit dem peptidspezifischen Antikörper (vgl. Abschnitt 3.1.2.2) und einem sekundären Cy3 Antikörper nachgewiesen.

Die Immunhistochemie zeigte anhand der Cy3 Fluoreszenz eine klare Überexpression in den Kardiomyozyten weiblicher und männlicher Cre/loxP (+/+) Tiere. In Abbildung 3-26 sind die Herzschnitte weiblicher und männlicher Cre/loxP (+/+) den korrespondierenden WT Tieren gegenübergestellt. Die Kardiomyozyten der Cre/loxP (+/+) Tiere zeigten eine leuchtend rote Fluoreszenz, die das Vorhandensein

von Cyp4a12a signalisierte. Kardiomyozyten zeigen leichte grünliche Eigenfluoreszenz, die bei den WT Tieren beobachtet wurde.



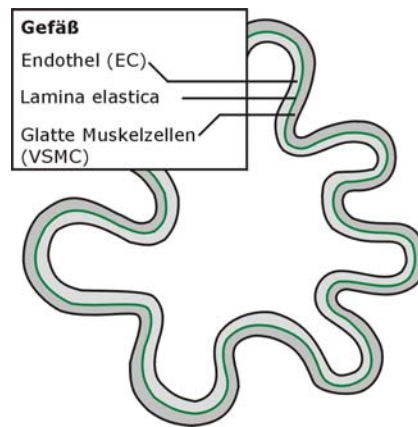
**Abbildung 3-26: Immunhistochemie an Kryo-Schnitten von Herzen aus Cyp412a Cre/loxP (+/+) und WT Mäusen.**

Rot fluoreszierend ist Cyp4a12a markiert. Grün ist die Eigenfluoreszenz der Kardiomyozyten und der Lamina elastica. Frische Herzen wurden in Stickstoff schockgefroren. Aus den Herzen wurden Kryo-Schnitte angefertigt, die mit dem in Abschnitt 3.1.2.2 beschriebenen peptidspezifischen Antikörper ab-4a12 und anschließend mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper (Cy3) inkubiert wurden. In Cre/loxP (+/+) war eine deutliche Überexpression von Cyp4a12a in Kardiomyozyten und VSMC zu erkennen.

In Abbildung 3-26 ist auch die Expression von Cyp4a12a in Gefäßen zu erkennen. Eine schematische Darstellung des Querschnittes eines Gefäßes ist in Abbildung 3-27 gezeigt. Die Innenseite eines Blutgefäßes ist mit EC ausgekleidet, dann folgt die Lamina elastica mit einer grünen Eigenfluoreszenz, gefolgt von den VSMC. In Abbildung 3-26 sind die Gefäße gut anhand der Lamina elastica zu erkennen. Die umgebenden VSMC zeigen in den Cre/loxP (+/+) Tieren eine deutlich stärkere



Färbung als in den WT, was auf eine Überexpression von Cyp4a12a in den VSMC hindeutet.



**Abbildung 3-27: Schematische Darstellung des Querschnitts eines Blutgefäßes.**

Die Innenseite eines Blutgefäßes ist mit EC ausgekleidet, es folgen Lamina elastica, die eine grüne Eigenfluoreszenz zeigt, und VSMC.

### 3.5 Inhibition der 20-HETE Produktion durch HET0016

#### **Kapitelübersicht:**

HET0016 ist ein reversibler kompetitiver Hemmstoff der 20-HETE Bildung, der sowohl in humanen als auch in Rattennierenmikrosomen wirksam ist. Dabei liegt der  $IC_{50}$  von HET0016 für die Umsetzung von AA durch Rattennierenmikrosomen bei  $35,2 \pm 4,4$  nM [88]. In diesem Abschnitt wird die Untersuchung der Hemmung der Cyp4a-Isoformen der Maus und des AA Metabolismus von Mausleber-, Mausnieren-, Rattennieren- und humanen Lebermikrosomen durch HET0016 vorgestellt.

Für die Analyse der Wirksamkeit von HET0016 als Hemmstoff wurde ein Konzentrationsbereich von 35 nM bis 1  $\mu$ M gewählt. HET0016 wurde gleichzeitig mit dem Substrat (30  $\mu$ M LA, 10 bzw. 20  $\mu$ M AA, vgl. Abschnitt 2.6.2 in Material und Methoden) und den Mikrosomen (10 pmol Cyp4a-Enzym, 80  $\mu$ g mikrosomales Protein) in einem Reaktionsvolumen von 100  $\mu$ l vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit NADPH gestartet und mit Zitronensäure gestoppt (10, 20 oder 30 Minuten Inkubationszeit, vgl. Abschnitt 2.6.2 in Material und Methoden). Die Analyse wurde

nach der Extraktion und der Trennung der Metabolite mit der RP-HPLC mit dem Programm Class-VP (Shimadzu) durchgeführt.

HET0016 hemmte die rekombinanten Cyp4a-Isoformen der Maus erst bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M (Abschnitt 3.5.1). Keine der vier Isoformen wurde in ihrem LA Metabolismus vollständig gehemmt (Abbildung 3-28). Mit AA als Substrat konnte nur Cyp4a12b durch 1  $\mu$ M HET0016 vollständig gehemmt werden (Abbildung 3-28).

Weder bei AA Umsätzen durch Mausleber- (Abschnitt 3.5.2, Abbildung 3-30, Abbildung 3-31), noch durch Mausnierenmikrosomen war eine selektive Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 zu erkennen. Hohe Konzentrationen von HET0016 (1  $\mu$ M) führten zu einer unspezifischen Hemmung aller AA Hydroxylierungs- und Epoxydationsreaktionen.

In Nierenmikrosomen aus männlichen SD Ratten hemmten 35 nM HET0016 die 20-HETE Bildung vollständig (Abschnitt 3.5.3, Abbildung 3-32). Die Bildung anderer Metabolite wurde nicht beeinflusst. Die renale mikrosomale 20-HETE Bildung von männlichen und weiblichen Lewisratten ließ sich gleichermaßen Dosis-abhängig hemmen und ergab einen  $IC_{50}$  von ca. 20 nM (Abbildung 3-33).

Der AA Metabolismus menschlicher Lebermikrosomen wurde durch 35 nM HET0016 (35 nM) stark in der Hydroxylaseaktivität (84 %) und nur leicht in der Epoxygenaseaktivität (31 %) gehemmt (Abschnitt 3.5.4, Abbildung 3-34).

### 3.5.1 Hemmung rekombinanter Cyp4a-Isoformen der Maus durch HET0016

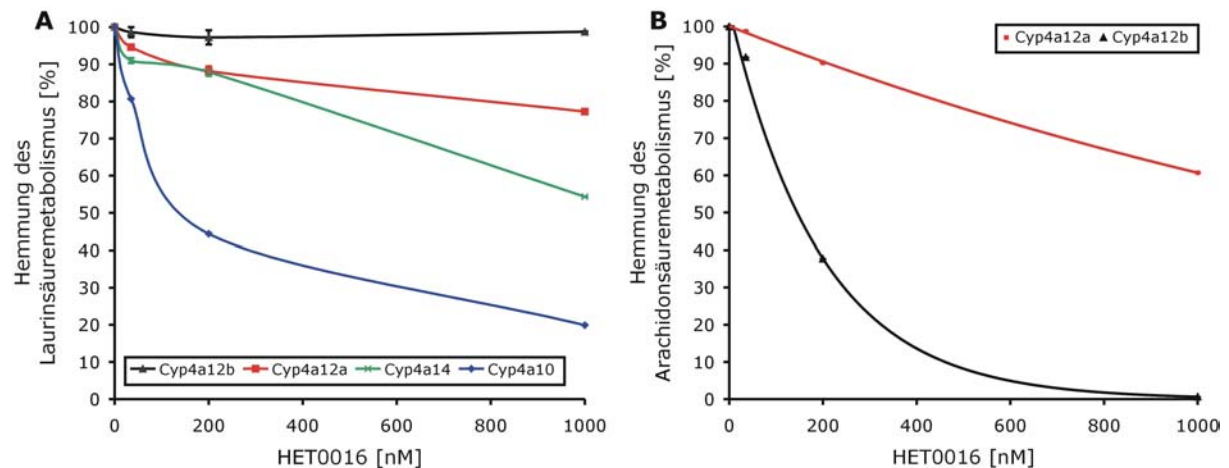
Die enzymatischen Eigenschaften von Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b und Cyp4a14 beim LA und AA Metabolismus sind in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

Die Cyp4a-Isoformen hydroxylierten LA effektiv zu 11- und 12-OH-LA, so lag die Umsatzgeschwindigkeit von Cyp4a12b, der aktivsten LA Hydroxylase der Maus, bei  $32,5 \pm 0,3$  nmol/nmol/min. Die LA Hydroxylierung lief in der für die jeweilige Isoform spezifischen Regioselektivität ab (vgl. Abschnitt 3.1.3.1).

HET0016 hatte die stärkste Hemmwirkung auf die durch **Cyp4a10** katalysierte LA Hydroxylierung. Bei einer Konzentration von 35 nM HET0016 wurde die LA Hydroxylierung durch Cyp4a10 um 19 %, bei 200 nM um 56 % und bei 1000 nM um 80 % gehemmt (Abbildung 3-28A).

**Cyp4a12a** und **Cyp4a14** wurden in gleichem Umfang gehemmt: eine Konzentration von 35 nM führte zu einer Hemmung um 5 % bzw. um 9 %, eine Konzentration von 200 nM zu einer Hemmung um 12% in beiden Fällen und eine Konzentration von 1000 nM zu einer Hemmung von 23 % bzw. 46 % (Abbildung 3-28A).

Auf die durch **Cyp4a12b** katalysierte LA Hydroxylierung hatte HET0016 in der hier verwendeten Konzentrationsspanne keine Auswirkungen (Abbildung 3-28A).



**Abbildung 3-28: HET0016-Hemmung der Cyp4a katalysierten Hydroxylierung von Laurinsäure (A) und Arachidonsäure (B).**

In einem 100 µl Reaktionsansatz wurden 10 µM LA, bzw. AA mit 10 pmol Cyp4a-Enzym für 3, bzw. 20 Minuten inkubiert. In DMSO gelöstes HET0016 wurde in Konzentrationen von 35, 200 und 1000 nM eingesetzt; in der Kontrollreaktion wurde DMSO (0,5% im Reaktionsansatz) verwendet. A: Bei der LA Hydroxylierung zeigte HET0016 die stärkste Hemmwirkung auf Cyp4a10 (blaue Kurve), gefolgt von Cyp4a14 (grüne Kurve) und Cyp4a12a (rote Kurve). Die Cyp4a12b (schwarze Kurve) katalysierte LA Hydroxylierung wurde durch HET0016 nicht gehemmt. B: Cyp4a12a (rote Kurve) wurde durch HET0016 in ähnlichem Umfang bei der AA wie bei der LA Hydroxylierung gehemmt. Cyp4a12b (schwarze Kurve) wurde im AA Umsatz von 1 µM HET0016 vollständig gehemmt. Die Punkte entsprechen Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen.

Nur die Isoformen Cyp4a12a und Cyp4a12b waren in der Lage, AA effizient zu metabolisieren (vgl. Abschnitt 3.1.3.2). Dabei entstanden bei der Cyp4a12a katalysierten AA Hydroxylierung die Primärmetabolite 19-/20-HETE und bei der Cyp4a12b katalysierten AA Hydroxylierung 18-/19-/20-HETE. Die Enzyme erreichten Umsatzgeschwindigkeiten von  $1,3 \pm 0,06$  (Cyp4a12a) und  $0,8 \pm 0,03$  nmol/nmol/min (Cyp4a12b).

**Cyp4a12a** wurde bei der AA Hydroxylierung durch 35 nM HET0016 um 1 %, durch 200 nM um 10 % und durch 1000 nM um 39 % gehemmt (Abbildung 3-28B). Das

Ausmaß der Hemmung der Cyp4a12a katalysierten AA Hydroxylierung war vergleichbar mit dem der Cyp4a12a katalysierten LA Hydroxylierung.

Die Aktivität von **Cyp4a12b** wurde mit AA als Substrat stark durch HET0016 gehemmt. Mit 35 nM HET0016 wurde die Cyp4a12b katalysierte AA Hydroxylierung um 8 %, mit 200 nM um 62 % und mit 1000 nM um 99 % gehemmt (Abbildung 3-28B).

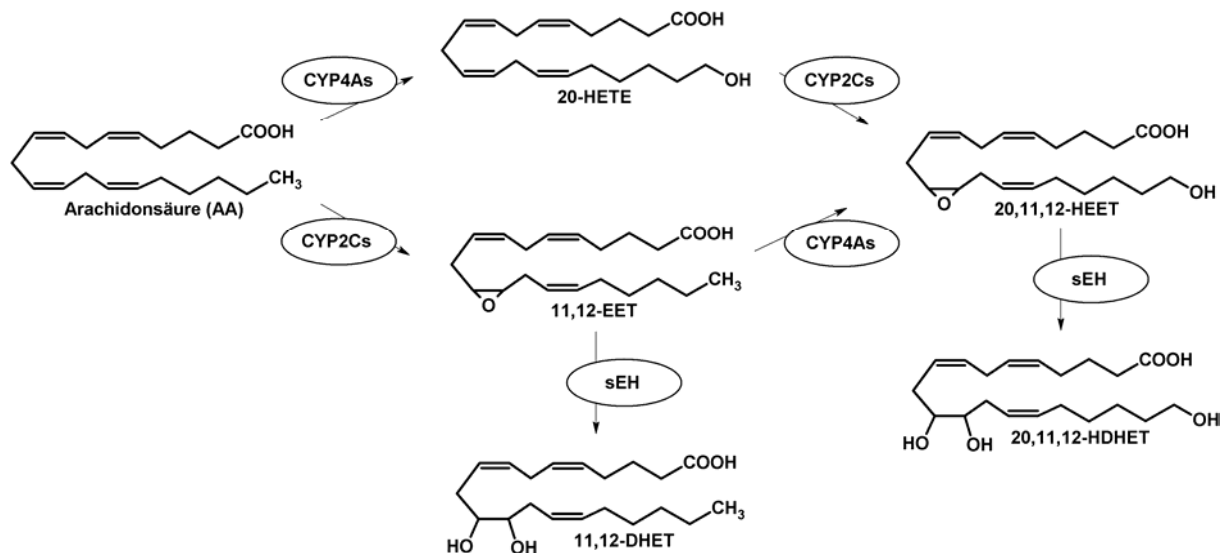
### 3.5.2 Hemmbarkeit des mikrosomalen AA Metabolismus der Maus durch HET0016

Für die Inhibitionsversuche an Mausniere und –leber wurden die mikrosomalen Nieren- bzw. Leberfraktionen mehrerer FVB/N Männchen gepoolt (Nieren- bzw. Lebermikrosomenpool). Die Hemmwirkung von HET0016 auf den mikrosomalen AA-Metabolismus wurde in Dreifachbestimmungen ermittelt.

#### 3.5.2.1 Hemmung des mikrosomalen AA Metabolismus der Mausleber durch HET0016

Mauslebermikrosomen setzten AA zu den Primärprodukten 19-/20-HETE und 11,12-EET, sowie weiteren regioisomeren EETs um. Sekundärmetabolite waren DHETs, Hydroxy-EETs (HEETs) und Hydroxy- Dihydroxyeicosatriensäuren (HDHETs). In Abbildung 3-29 sind zum besseren Verständnis die Strukturformeln von AA und möglichen Primär- und Sekundärmetaboliten dargestellt.

Die Hydroxylaseaktivität lag bei  $27,3 \pm 2,4$  pmol/mg Protein/min und die Epoxygenaseaktivität bei  $99,7 \pm 14,2$  pmol/mg Protein/min. In Abbildung 3-30A sind repräsentative Chromatogramme des AA Metabolismus des Mauslebermikrosomenpools mit und ohne HET0016 dargestellt. HDHETs eluierten zwischen 4 und 6 Minuten, DHETs zwischen 12,5 und 14,5 Minuten, 19-HETE bei 15,8 Minuten, 20-HETE bei 16 Minuten und EETs zwischen 23,5 und 25,3 Minuten. Die Mauslebermikrosomen wurden in ihrer Hydroxylaseaktivität von HET0016 kaum beeinflusst (Abbildung 3-30B). Bei 35 nM HET0016 war die Hydroxylaseaktivität unverändert, 200 nM HET0016 hemmten die Aktivität um 8 % und 1000 nM um 17 %.

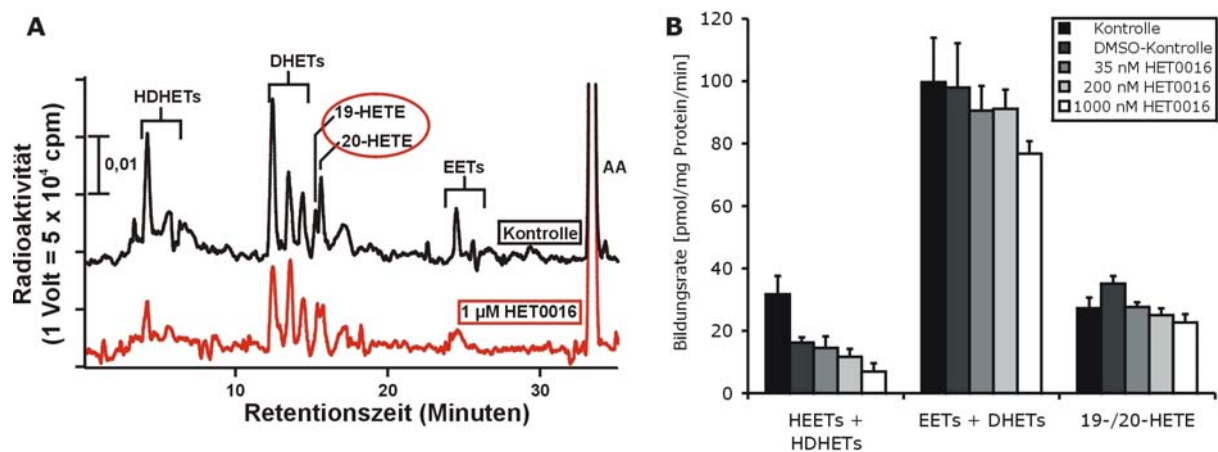


**Abbildung 3-29: Arachidonsäure und mögliche CYP- und sEH-abhängige Primär und Sekundärmetabolite.**

AA kann durch CYP4As zu 20-HETE und durch CYP2Cs beispielsweise zu 11,12-Epoxyeicosatriensäure (11,12-EET) metabolisiert werden. 20-HETE ist ein Substrat für CYP2Cs und 11,12-EET ein Substrat für CYP4As, der resultierende Sekundärmetabolit ist 20-Hydroxy-11,12-Epoxyeicosatriensäure (20,11,12-HEET). Die Epoxygruppen der EETs und der HEETs kann durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) hydrolysiert werden. Dabei entsteht beispielsweise aus 11,12-EET die korrespondierende 11,12-Dihydroxyeicosatriensäure (11,12-DHET) und aus 20,11,12-HEET die korrespondierende 20-Hydroxy-11,12-Dihydroxyeicosatriensäure (20,11,12-HDHET).

Die Epoxygenaseaktivität wurde durch DMSO nicht beeinflusst, durch 35 nM HET0016 um 9 %, durch 200 nM HET0016 ebenfalls um 9 % und durch 1000 nM um 23 % gehemmt (Abbildung 3-30B).

HET0016 hatte einen großen Einfluss auf die Bildung von Sekundärprodukten. So wurde die Bildung von HEETs und HDHETs durch DMSO um 49 %, durch 35 nM HET0016 um 54 %, durch 200 nM HET0016 um 63 % und durch 1000 nM um 78 % gehemmt (Abbildung 3-30B).



**Abbildung 3-30: Wirkung von HET0016 auf den mikrosomalen AA Metabolismus der Leber von FVB/N Männchen.**

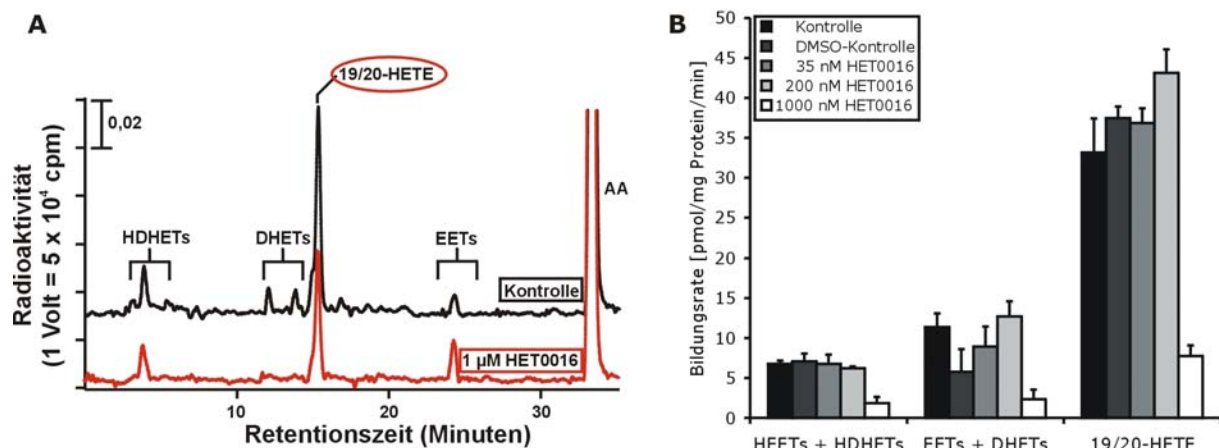
A: Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme von AA Umsätzen durch Mauslebermikrosomen ohne und mit 1 µM HET0016. 20 µM AA wurde im 100 µl Standardansatz mit 80 µg mikrosomalem Protein (Lebermikrosomenpool männlicher FVB/N Mäuse) in 30 Minuten umgesetzt. Primärprodukte waren 19-/20-HETE (16 Minuten) und regioisomere EETs (23,5–25,3 Minuten). Sekundärprodukte waren HDHEETs (4-6 Minuten) und DHETs (12,5-14,5 Minuten).

B: Quantitative Auswertung der HET0016 Hemmung des AA Metabolismus durch Mauslebermikrosomen. Nur die Sekundärproduktbildung wird durch niedrige Konzentrationen HET0016 gehemmt. Eine Hemmung der Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität tritt erst bei einer HET0016 Konzentration von 1 µM auf. Die Werte sind Mittelwert ± SD aus Dreifachbestimmungen.

### 3.5.2.2 Hemmung des mikrosomalen AA Metabolismus der Mausniere durch HET0016

Mausnierenmikrosomen hydroxylierten und epoxydierten AA zu den Hauptprodukten 19-/20-HETE und 11,12-EET. 11,12-EET wurde teilweise weiter in 11,12-DHET umgewandelt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Die Mikrosomen wiesen eine Hydroxylaseaktivität von  $33,2 \pm 4,3$  pmol/mg Protein/min und eine Epoxygenaseaktivität von  $11,4 \pm 1,7$  pmol/mg Protein/min auf. In Abbildung 3-31A sind repräsentative Chromatogramme des AA Metabolismus des Mausnierenmikrosomenpools mit und ohne HET0016 dargestellt. HDHETs eluierten zwischen 4 und 6 Minuten, DHETs zwischen 12,5 und 14,5 Minuten, 19-HETE bei 15,8 Minuten, 20-HETE bei 16 Minuten und 11,12-EET bei 24,9 Minuten.

HET0016 zeigte keine selektive Hemmung der Hydroxylaseaktivität der Mausnierenmikrosomen. Erst eine Konzentration von 1 µM HET0016 hemmte die Hydroxylaseaktivität, ebenso wie die Epoxygenaseaktivität von 1 µM um ca. 80 % (Abbildung 3-31B). Die Sekundärproduktbildung war weitgehend unbeeinflusst und wurde erst bei 1 µM HET0016 um 73 % gehemmt (Abbildung 3-31B).



**Abbildung 3-31: Wirkung von HET0016 auf den renalen mikrosomalen AA Metabolismus von FVB/N Männchen.**

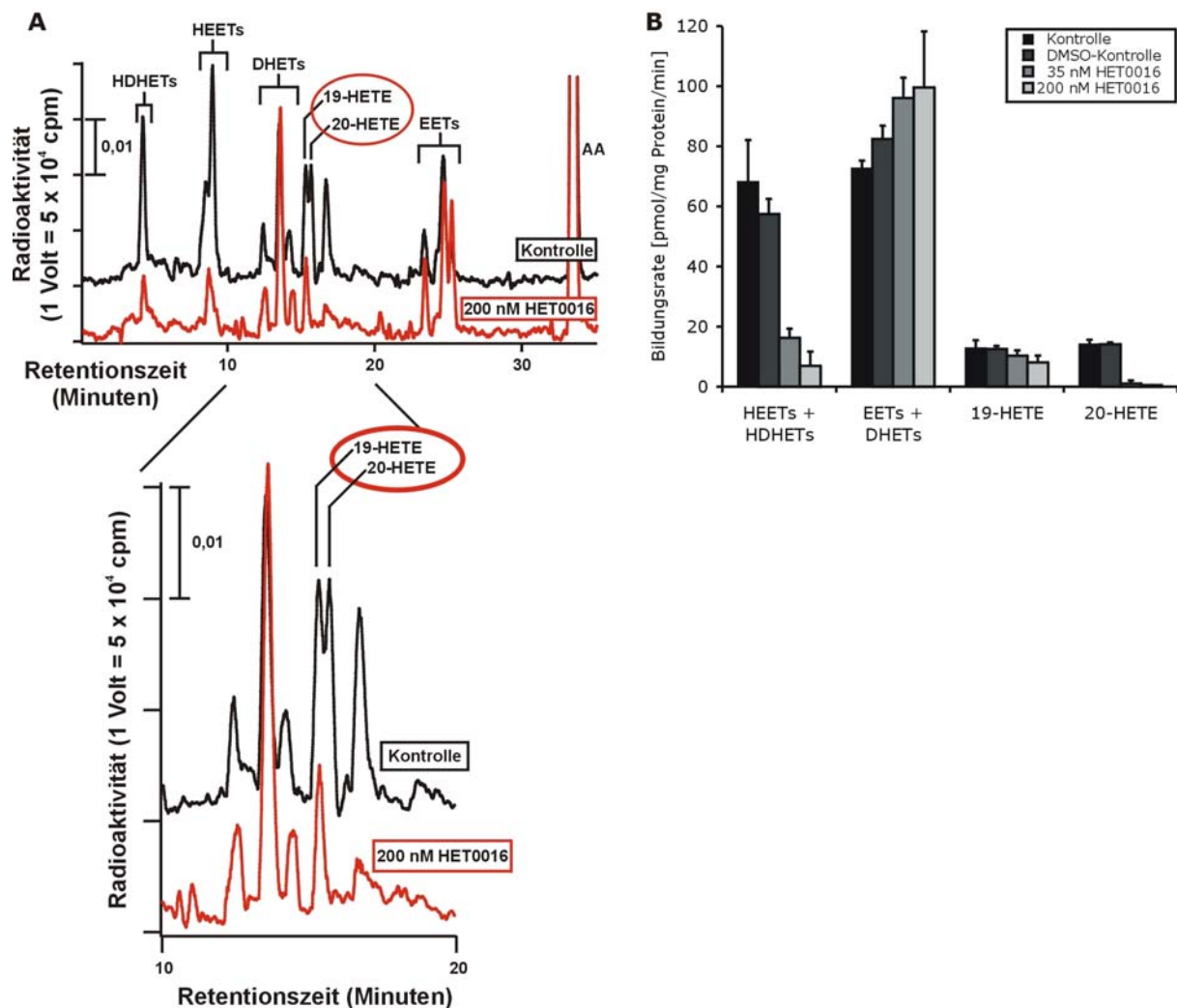
A: Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme von AA Umsätzen durch Mausnierenmikrosomen ohne und mit 1  $\mu\text{M}$  HET0016. 20  $\mu\text{M}$  AA wurde im 100  $\mu\text{l}$  Standardansatz mit 80  $\mu\text{g}$  mikrosomalem Protein (Nierenmikrosomenpool männlicher FVB/N Mäuse) in 30 Minuten umgesetzt. Primärprodukte waren 19-/20-HETE (16 Minuten) und 11,12-EET (24,9 Minuten). Die Sekundärproduktbildung war gering ausgeprägt und bestand aus HEETs (4-6 Minuten) und DHETs (12,5-14,5 Minuten).

B: Quantitative Auswertung der HET0016 Hemmung des AA Metabolismus durch Mausnierenmikrosomen. Eine Hemmung der Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität tritt erst bei einer HET0016 Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf. Die Werte sind Mittelwert  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

### 3.5.3 Hemmbarkeit des mikrosomalen AA Metabolismus der Rattenniere durch HET0016

Für die HET0016 Hemmung der AA Hydroxylierung durch Rattennierenmikrosomen wurden Nierenmikrosomen von männlichen SD Ratten gepoolt. Die Reaktionen zum AA Metabolismus wurden dreifach wiederholt.

Bei den AA Umsetzungen durch Rattennierenmikrosomen wurden 19-/20-HETE, 11,12-EET und weitere regioisomere EETs als Primärmetabolite gebildet. Als Sekundärmetabolite traten DHETs und HEETs auf. Die HEETs wurden teilweise zu HDHETs hydrolysiert (Abbildung 3-32A). Die Nierenmikrosomen wiesen unter den gewählten Bedingungen (20  $\mu\text{M}$  AA, 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein, 30 Minuten Inkubationszeit) eine Hydroxylaseaktivität von  $27,0 \pm 3,9$  pmol/mg Protein/min und eine Epoxygenaseaktivität von  $72,7 \pm 2,6$  pmol/mg Protein/min auf.



**Abbildung 3-32: Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 in Nierenmikrosomen von SD Ratten.**

A: Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme von AA Umsätzen durch Rattennierenmikrosomen ohne und mit 200 nM HET0016. 20  $\mu$ M AA wurde im 100  $\mu$ l Standardansatz mit 80  $\mu$ g mikrosomalem Protein (Nierenmikrosomenpool männlicher SD Ratten) in 30 Minuten umgesetzt. Primärprodukte waren 19-/20-HETE (16 Minuten) und regioisomere EETs (23,5-25,3 Minuten). Die Sekundärprodukte waren HDHETs (4-5 Minuten), HEETs (9-10 Minuten) und DHETs (12,5-14,5 Minuten). Am vergrößerten Ausschnitt des Chromatogramms kann man die selektive Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 erkennen (Kontrolle: 20-HETE bei 16 Minuten; 200 nM HET0016: kein Produktpeak bei 16 Minuten, nahezu vollständigem Erhalt der 19-HETE Bildung bei 15,8 Minuten).

B: Quantitative Auswertung der HET0016 Hemmung des AA Metabolismus durch Rattennierenmikrosomen. Die  $\omega$ -Hydroxylierung von AA wird durch 35 nM HET0016 nahezu vollständig gehemmt. Auch die Bildung von HEETs wird stark reduziert (200 nM HET0016: 90 %ige Reduktion). Die Werte sind Mittelwert  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

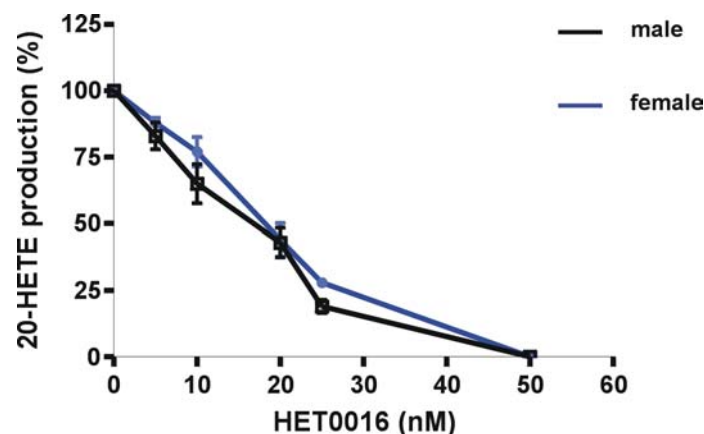
Die  $\omega$ -Hydroxylaseaktivität der Rattennierenmikrosomen wurde durch 35 nM HET0016 um 93 % und durch 200 nM HET0016 um 96 % gehemmt. Die Aktivität wurde durch DMSO nicht beeinflusst (Abbildung 3-32A und B). Die ( $\omega$ -1)-



Hydroxylaseaktivität wurde deutlich weniger beeinflusst: 20 %ige Hemmung durch 35 nM HET0016, und 37 %ige Hemmung durch 200 nM HET0016 (Abbildung 3-32B).

Die Sekundärproduktbildung (HEETs/HDHETs) wurde ebenfalls durch HET0016 gehemmt. 35 nM HET0016 reduzierten die Produktion von HEETs/HDHETs um 76 % und 200 nM HET0016 um 90 %. Im Gegenzug stieg die Fraktion der EETs an: bei 35 nM HET0016 lag der Gehalt der EETs bei 132 % und bei 200 nM HET0016 bei 137 %. Dies deutet auf eine Hemmung der Hydroxylierungsreaktion der EETs hin (Abbildung 3-32B).

Eine Dosis-abhängige Hemmung der renalen mikrosomalen Bildung von 20-HETE wurde an männlichen und weiblichen Lewisratten gezeigt (Abbildung 3-33). Die 20-HETE-Bildung wurde in beiden Geschlechtern in gleichem Umfang gehemmt. Eine nahezu vollständige Unterdrückung der 20-HETE Bildung wurde bereits durch 50 nM HET0016 bei einer physiologischen AA Konzentration von 10  $\mu$ M erreicht. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich ein ungefähres  $IC_{50}$  von 20 nM.



**Abbildung 3-33: Dosis-Wirkungskurve für die Hemmung der 20-HETE Produktion in Nierenmikrosomen männlicher und weiblicher Lewisratten durch HET0016.**

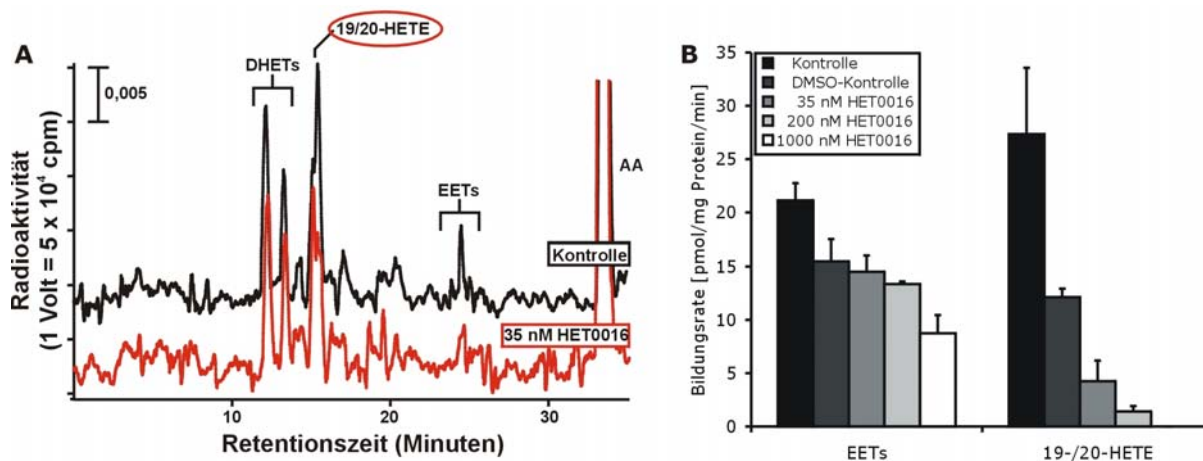
10  $\mu$ M AA wurde im 100  $\mu$ l Standardansatz mit 80  $\mu$ g mikrosomalem Protein (männliche und weibliche Lewisratten,  $n=6 \pm$  SEM) in 20 Minuten umgesetzt. Die Hemmung wurde mit 5, 10, 20, 25 und 50 nM HET0016 im Reaktionsansatz durchgeführt.

### 3.5.4 Hemmbarkeit des mikrosomalen AA Metabolismus der menschlichen Leber durch HET0016

AA wurde von humanen Lebermikrosomen, die uns von Uli Zanger (Bosch Institut für Pharmakologie) zur Verfügung gestellt wurden, zu 19-/20-HETE hydroxyliert und den regioisomeren EETs epoxydiert (Abbildung 3-34A). Die EETs wurden zu den korrespondierenden DHETs hydrolysiert. Es lag keine CYP katalysierte Sekundärproduktbildung vor. Die Umsatzgeschwindigkeit für die Hydroxylierungsreaktion lag bei  $27,3 \pm 6,2$  pmol/mg Protein/min und für die Epoxydationsreaktion bei  $21,1 \pm 1,6$  pmol/mg Protein/min.

Überraschenderweise wurde die Hydroxylaseaktivität humaner Lebermikrosomen bereits durch DMSO um 46 % gehemmt. 35 nM HET0016 führten zu einer Hemmung um 84 %, 200 nM HET0016 um 94 % und 1000 nM HET0016 um 100 % (Abbildung 3-34B).

Auch die Epoxygenaseaktivität der humanen Lebermikrosomen wurde beeinflusst, es lag jedoch keine so starke Hemmung vor: DMSO führte zu einer Hemmung um 27 %, 35 nM HET0016 zu 31 %iger, 200 nM HET0016 zu 37 %iger und 1000 nM HET0016 um 59 %iger Hemmung (Abbildung 3-34B).



**Abbildung 3-34: Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 in humanen Lebermikrosomen.**

A: Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme von AA Umsätzen durch humane Lebermikrosomen ohne und mit 35 nM HET0016. 10  $\mu$ M AA wurde im 100  $\mu$ l Standardansatz mit 80  $\mu$ g mikrosomalem Protein (humaner Lebermikrosomenpool) in 20 Minuten umgesetzt. Primärprodukte waren 19-/20-HETE (16 Minuten) und regioisomere EETs (23,5-25,3 Minuten). Als Sekundärprodukte traten nur DHETs (12,5-14,5 Minuten) auf. Bei 16 Minuten kann man die selektive Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 erkennen.

B: Quantitative Auswertung der HET0016 Hemmung des AA Metabolismus humaner Lebermikrosomen. Die  $\omega$ -Hydroxylierung von AA wird durch 200 nM HET0016 nahezu vollständig gehemmt. Die Werte sind Mittelwert  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

### 3.6 Hemmung der $\omega$ -Hydroxylaseaktivität durch HET0016 bei Uninephrektomie und I/R

#### Kapitelübersicht:

Ziel dieses Projektes war zum einen, den Einfluss von Uninephrektomie auf die renale mikosomale 20-HETE Bildung und zum zweiten die Rolle von 20-HETE bei der Entstehung von I/R-induzierten Nierenschäden zu untersuchen. Am Tiermodell der Lewisratte wurden dazu fünf Gruppen untersucht: (1) Absolute Kontrollen, die weder Uninephrektomie noch I/R erlitten, (2) HET0016 behandelte Kontrollen ohne Uninephrektomie und I/R, (3) unbehandelte Uninephrektomie, (4) unbehandelte Uninephrektomie mit I/R und (5) HET0016 behandelte Uninephrektomie mit I/R. Im Anschluss an die Behandlung der Ratten wurde der mikrosomale AA Metabolismus der Nieren männlicher und weiblicher Lewisratten analysiert.

In einem Standardansatz (100  $\mu$ l) wurden 100  $\mu$ M AA mit 80  $\mu$ g Protein aus Nierenmikrosomen für 20 Minuten inkubiert. Das Extrakt der Inkubation wurde mit RP-HPLC getrennt und die Peakflächen mit dem Programm Class-VP (Shimadzu) integriert.

Bei Uninephrektomie kam es in weiblichen Tieren zu einer signifikanten Steigerung der 20-HETE-Produktion. Zusätzliche I/R senkte die Kapazität der Nierenmikrosomen, 20-HETE zu bilden. Durch Vorbehandlung der Tiere mit HET0016 vor I/R ließ sich die Kapazität 20-HETE zu bilden teilweise wieder herstellen (Abbildung 3-35).

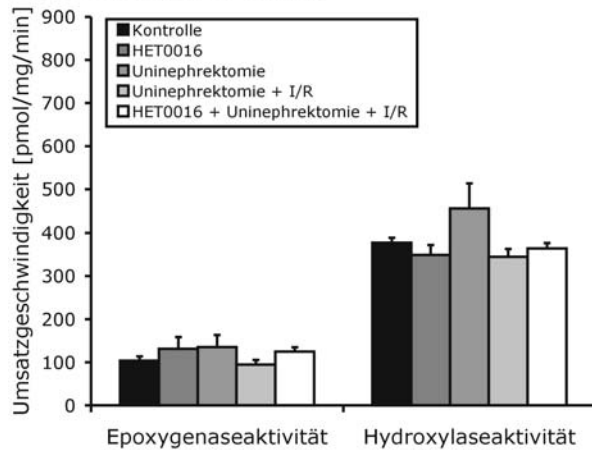
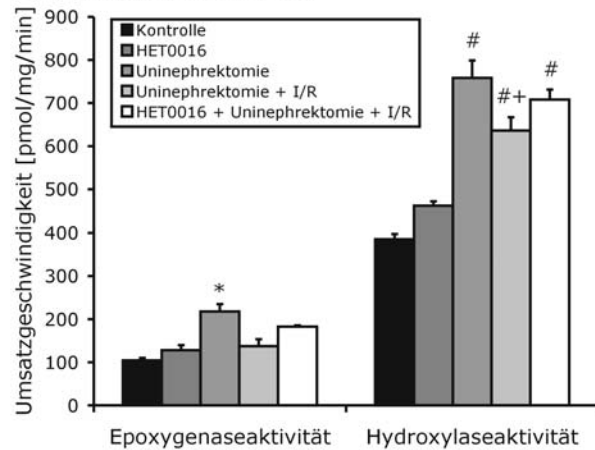
Diese Versuche fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Hoff und Prof. Dr. Duska Dragun (Nephrologie, Campus Virchow Klinikum, Charité Berlin) statt.

Die quantitative Auswertung der renalen mikrosomalen AA-Epoxygenase- und Hydroxylaseaktivitäten von männlichen und weiblichen Lewisratten sind in Abbildung 3-35 gezeigt.

Bei männlichen Tieren (Abbildung 3-35A) lag die Hydroxylaseaktivität bei  $378 \pm 11$  pmol/mg/min. Die Behandlung mit HET0016 senkte die Aktivität auf  $349 \pm 23$  pmol/mg/min. Eine Uninephrektomie führte zu einem 1,3-fachen Anstieg der Aktivität auf  $455 \pm 58$  pmol/mg/min. I/R verringerte die Kapazität der Niere 20-HETE zu bilden auf  $345 \pm 18$  pmol/mg/min. Die Behandlung mit HET0016 15 Minuten vor I/R bei Uninephrektomie führte zu einer verbesserten Hydroxylaseaktivität von  $364 \pm 13$  pmol/mg/min.

Bei der Epoxygenaseaktivität wies die Kontrolle eine Aktivität von  $103 \pm 10$  pmol/mg/min auf. HET0016 und Uninephrektomie führten zu einer Steigerung ( $131 \pm 27$  und  $135 \pm 28$  pmol/mg/min), Uninephrektomie und I/R zu einem Verlust ( $94 \pm 11$  pmol/mg/min) und die Behandlung mit HET0016 15 Minuten vor I/R bei Uninephrektomie zu einer Wiederherstellung ( $125 \pm 10$  pmol/mg/min) der Epoxygenaseaktivität. Keine der Behandlungen führte bei männlichen Lewisratten jedoch zu einer Veränderung des AA Metabolismus.

Bei den weiblichen Tieren waren die Auswirkungen der Behandlung deutlich größer (Abbildung 3-35B): Ausgehend von einer Hydroxylaseaktivität von  $385 \pm 12$  pmol/mg/min und einer Epoxygenaseaktivität von  $104 \pm 6$  pmol/mg/min führte eine Uninephrektomie zu einer Verdopplung der Aktivität auf  $758 \pm 40$  pmol/mg/min bzw.  $218 \pm 17$  pmol/mg/min. HET0016 steigerte die Hydroxylaseaktivität der Weibchen 1,2-fach auf  $462 \pm 10$  pmol/mg/min, ebenso wie die Epoxygenaseaktivität ( $128 \pm 12$  pmol/mg/min). I/R senkte bei Uninephrektomie sowohl die Kapazität 20-HETE als auch die EETs zu bilden ( $636 \pm 31$  und  $137 \pm 16$  pmol/mg/min). Eine HET0016 Behandlung bei I/R und Uninephrektomie führte zu einer teilweisen Wiederherstellung von Hydroxylase- und Epoxygenaseaktivität ( $708 \pm 23$  und  $183 \pm 3$  pmol/mg/min).

**A: Männliche Lewis Ratten****B: Weibliche Lewis Ratten**

**Abbildung 3-35: Veränderungen des renalen mikrosomalen AA Metabolismus bei Uninephrektomie, I/R und HET0016 Behandlung in Lewisratten.**

Quantitative Auswertung der RP-HPLC Chromatogramme von AA Umsetzungen (100 µl Reaktionsvolumen, 100 µM AA, 80 µg Protein, 20 Minuten) durch Nierenmikrosomen von Lewisratten. Die Ratten wurden verschiedenen Behandlungen unterzogen (Kontrolle, HET0016 Behandlung, Uninephrektomie, Uninephrektomie mit I/R und Uninephrektomie mit I/R und HET0016 Behandlung). Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6-8).

(A): Bei männlichen Lewisratten führte keine der oben genannten Behandlungen zu signifikanten Unterschieden im mikrosomalen AA Metabolismus der Niere.

(B): Weibliche Lewisratten mit Uninephrektomie zeigten signifikant höhere Epoxygenaseaktivitäten als Kontrollweibchen (\*,  $p < 0,01$ ). Die oben genannten Behandlungen führten bei der Hydroxylaseaktivität zu signifikanten Unterschieden: alle Weibchen mit Uninephrektomie hatten höhere Hydroxylaseaktivitäten als die korrespondierenden Kontrollen (# gegenüber der Kontrolle und dem HET0016 behandelten Tier ( $p < 0,001$ )). I/R führte zu einer Verringerung der Hydroxylaseaktivität (+ gegenüber der Uninephrektomie ( $p < 0,01$ )), die durch HET0016 Behandlung teilweise wieder aufgehoben werden konnte.

Der experimentelle Aufbau des Tierversuchs beinhaltet eine zweitägige Reperfusionsphase nach Ischämie. Daher sagt die gemessene renale mikrosomale 20-HETE Bildung nichts über die akute 20-HETE Freisetzung und damit die Rolle von 20-HETE bei Ischämie aus. Die I/R-induzierte Nierenschädigung wurde von Prof. Dr. Duska Dragun und Dr. Uwe Hoff (Charité) untersucht. Da HET0016 ein reversibler Inhibitor der CYP4A-Enzyme ist, kommt es zu einer Erholung der mikrosomalen 20-HETE Bildung in der Tiergruppe der mit HET0016 behandelten, uninephrektomierten Tiere mit I/R.

### 3.7 Untersuchungen zur Aktivität und Funktion der sEH in verschiedenen Tiermodellen und an rekombinanten Enzymen

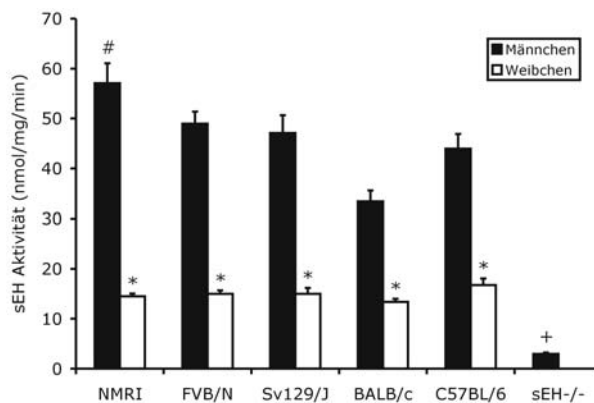
#### 3.7.1 Stamm- und geschlechtsspezifische sEH Aktivität in der Mausniere

##### **Kapitelübersicht:**

Die in Abschnitt 3.2 vorgestellten Mausstämme (NMRI, FVB/N, Sv129/J, BALB/c und C57BL/6) wurden auf stamm- und geschlechtsspezifische Ausprägung der sEH Aktivität in der Niere untersucht. Zusätzlich wurde ein sEH knockout Stamm (C57BL/6-ByJ Hintergrund) auf seine renale Hydrolaseaktivität getestet. Dazu wurde [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-markiertes 14,15-EET mit zytosolischen Fraktionen umgesetzt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Umsätze wurden extrahiert, mittels RP-HPLC getrennt und die Peakflächen mit der Shimadzu Class-VP Software integriert.

In den Mausstämmen NMRI, FVB/N, Sv129/J, BALB/c und C57BL/6 gab es signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede in der Hydrolaseaktivität der sEH: Alle männlichen Tiere wiesen eine höhere Hydrolaseaktivität auf als weibliche (Abbildung 3-36). Signifikante Stammunterschiede in der Hydrolaseaktivität existierten zwischen männlichen NMRI (höchste) und BALB/c (niedrigste).

In der renalen Aktivität der löslichen Epoxidhydrolase wurden deutliche Geschlechtsunterschiede gefunden (Abbildung 3-36). Die männlichen Tiere aller Stämme mit Ausnahme des sEH knockout Stammes hatten eine doppelte bis dreifache Hydrolaseaktivität. Bei den Männchen hatten NMRI Mäuse die höchste Aktivität mit  $57,1 \pm 17,8$  nmol/mg/min, die niedrigste hatten BALB/c Mäuse mit  $33,4 \pm 9,8$  nmol/mg/min. Die Hydrolaseaktivität der Weibchen lag zwischen  $13,4 \pm 2,8$  (BALB/c) und  $16,8 \pm 5,8$  nmol/mg/min (C57BL/6) und unterschied sich somit kaum zwischen den Stämmen. Die Hydrolaseaktivität der sEH knockout Mäuse lag mit  $2,9 \pm 1,2$  nmol/mg/min im Bereich der Eigenhydrolyse des Substrates ( $3,4 \pm 0,3$  nmol/min). Verglichen mit den großen stammspezifischen Unterschieden der AA-Hydroxylaseaktivität (vgl. Abschnitt 3.2.3) waren die Unterschiede in der Hydrolaseaktivität weniger stark ausgeprägt.



**Abbildung 3-36: Geschlechts- und Stammunterschiede der sEH Aktivität in der Mausniere.**

Die sEH Aktivität männlicher und weiblicher Tiere der Stämme NMRI, FVB/N, SV129/J, BALB/c und C57BL/6 wurde in Standardreaktionen (50  $\mu$ l) mit 50  $\mu$ M 14,15-EET, 5  $\mu$ g Protein (100.000  $\times$  g Überstand) und 10 Minuten Inkubationszeit ermittelt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 pro Gruppe). Alle Männchen zeigten eine signifikant höhere Hydrolaseaktivität als die Weibchen (\*,  $P < 0,05$ ). Einen signifikanten Stammunterschied gab es zwischen männlichen NMRI und BALB/c (§,  $p < 0,05$ ). Die Hydrolaseaktivität der sEH knockout Mäuse war signifikant geringer als die aller männlichen Tiere (+,  $P < 0,001$ ) und lag mit im Bereich der Eigenhydrolyse des Substrates.

### 3.7.2 ADU Hemmung der Hydrolaseaktivität

#### Kapitelübersicht:

1-Adamantanyl-3-dodecyl-urea (ADU) ist ein kompetitiver Inhibitor der Hydrolaseaktivität der sEH [89]. In der vorliegenden Arbeit wurde seine Wirksamkeit in der zytosolischen Fraktion von Nieren, sowie in Gefäßen getestet.

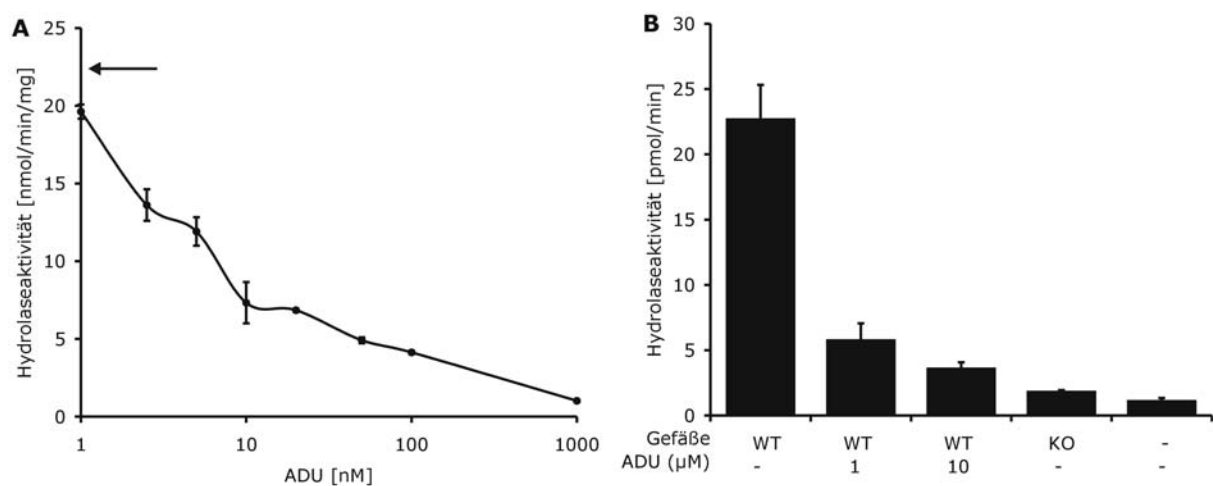
[1-<sup>14</sup>C]-markiertes 14,15-EET wurde mit der zytosolischen Fraktion der Nieren sowie isolierten Mesenterialarterien männlicher FVB/N Mäuse umgesetzt. Durch Zugabe steigender Konzentrationen ADU (1 bis 1000 nM bei Nierenumsätzen, 1 und 10  $\mu$ M bei isolierten Gefäßen) wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Umsätze wurden extrahiert, mittels RP-HPLC getrennt und die Peakflächen mit der Shimadzu Class-VP Software integriert.

Die Hydrolaseaktivität der sEH in renalen zytosolischen Fraktionen und in Mesenterialarterien von FVB/N Mäusen ist durch ADU dosisabhängig hemmbar (Abbildung 3-37).

ADU führte zu einer Verringerung der Hydrolaseaktivität (Abbildung 3-37). Die Hydrolaseaktivität der Nieren von FVB/N Männchen betrug  $22,5 \pm 1,1$  nmol/min/mg.

Inkubationen mit ADU führten zu einer Dosis abhängigen Hemmung der Hydrolaseaktivität (Abbildung 3-37A). Schon 1 nM ADU verringert die Hydrolaseaktivität um 13 %, 10 nM um 68 %, 100 nM um 82 % und 1  $\mu$ M um 97 %.

In der Mesenterialarterie – es wurden jeweils fünf gleich große Abschnitte von Ästen zweiter Ordnung verwendet – lag die Hydrolaseaktivität bei  $22,7 \pm 2,6$  pmol/min (Abbildung 3-37B). 1  $\mu$ M ADU führte zu einer Hemmung von 75 % ( $5,7 \pm 1,3$  pmol/min) und mit 10  $\mu$ M ADU zu einer Hemmung von 84 % ( $3,6 \pm 0,5$  pmol/min). sEH  $-/-$  Mäuse wiesen eine Hydrolaseaktivität von  $1,8 \pm 0,1$  pmol/min auf, die sich nur geringfügig vom Leerwert ( $1,1 \pm 0,25$  pmol/min) unterschied.



**Abbildung 3-37: Dosisabhängige Hemmung der Hydrolaseaktivität in der zytosolischen Fraktion von Nieren (A) und in isolierten Gefäßen (B) männlicher FVB/N Mäuse.**

(A) Die dosisabhängige Hemmung der renalen Hydrolaseaktivität wurde im Standardansatz (50  $\mu$ l) mit 10  $\mu$ M 14,15-EET, 2  $\mu$ g Protein (100.000  $\times$  g Überstand) und 4 Minuten Inkubationszeit ermittelt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=2$  pro Gruppe). Ausgehend von einer Hydrolaseaktivität von  $22,5 \pm 1,1$  nmol/mg/min (Kontrolle, indiziert durch den Pfeil) hemmten bereits 10 nM ADU die Aktivität um mehr als 50 % ( $7,3 \pm 1,3$  nmol/mg/min).

(B) Hydrolyse von 14,15-EET durch isolierte Mesenterialarterien aus Wildtyp (WT) und sEH knockout Mäusen (KO). 1 und 10  $\mu$ M ADU hemmten die sEH Aktivität der Gefäße signifikant ( $P<0,01$ ). Die Gefäße der KO Mäuse zeigten nur eine sehr geringe sEH Aktivität, vergleichbar mit der Eigenhydrolyse (letzte Säule). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n\geq 3$ ).



### 3.7.3 Lokalisierung der sEH in Kardiomyozyten

**Kapitelübersicht:**

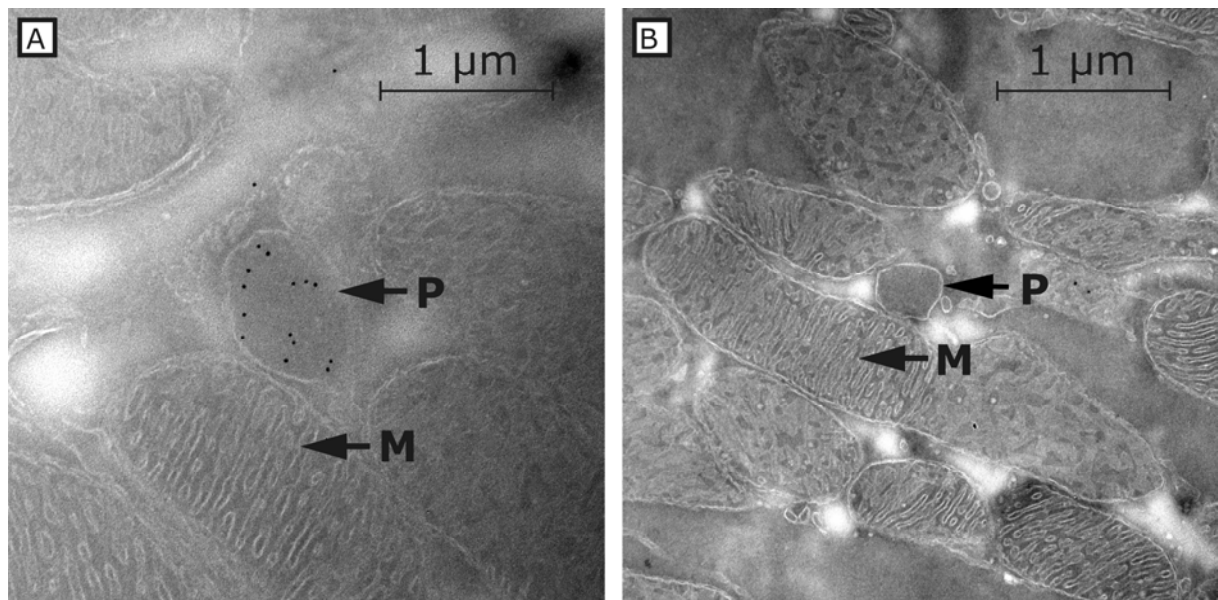
Die sEH kann innerhalb der Zelle im Zytosol und in den Peroxisomen lokalisiert sein. Die Lokalisierung könnte entscheidend für ihre ausgeübte enzymatische Funktion, Phosphatase oder Hydrolase, sein (vgl. Abschnitt 1.7 in der Einleitung). Dieses Experiment diente der Lokalisierung der sEH im Herzen unter Basalbedingungen.

Um die sEH in Kardiomyozyten zu lokalisieren, wurden Ultradünnschnitte von Herzen von FVB/N Wildtyp und sEH knockout Mäusen angefertigt (vgl. Abschnitt 2.3.4 in Material und Methoden). Der Nachweis der sEH wurde mit primären Antikörpern gegen rekombinante gereinigte sEH aus der Maus und anschließender Goldmarkierung durchgeführt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine vorwiegende Expression der sEH in Peroxisomen der Kardiomyozyten von FVB/N Wildtyp Mäusen unter Basalbedingungen (Abbildung 3-38).

Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten von Herzen von FVB/N Wildtyp und sEH knockout Mäusen konnte die sEH unter Basalbedingungen in den Peroxisomen lokalisiert werden (Abbildung 3-38).

In Abbildung 3-38 sind die Ultrastrukturen der Kardiomyozyten mit zahlreichen vertretenen Mitochondrien gut zu erkennen. In Kardiomyozyten von FVB/N Wildtyp Männchen (Abbildung 3-38A) war eine Vielzahl von Goldmarkierungen im Peroxysom zu erkennen (durch einen Pfeil gekennzeichnet). Es lagen nur wenige Goldmarkierungen außerhalb der Peroxisomen vor. Im Gegensatz hierzu war in den Kardiomyozyten von sEH knockout Mäusen (Abbildung 3-38B) weder eine Goldmarkierung in Peroxysomen noch im Zytosol zu erkennen, vereinzelte Markierungen, die vermutlich unspezifisch waren, lagen in den Mitochondrien vor.



**Abbildung 3-38: Elektronenmikroskopischer Nachweis der sEH in Ultradünnschnitten des Herzens von FVB/N Wildtyp (A) und sEH knockout (B) Mäusen.**

P: Peroxysom; M: Mitochondrium. Ultradünnschnitte wurden aus fixierten (Formaldehyd/Glutaraldehyd, vgl. 2.3.4 in Material und Methoden) Mausherzen gefertigt. Der primäre Antikörper war gegen die gereinigte rekombinante sEH der Maus.

(A) Die Goldmarkierung zeigte in den WT Mäusen deutlich eine vorwiegend peroxysomale Lokalisierung der sEH. Einige Goldmarkierungen lagen auch im Zytosol und in Mitochondrien vor.

(B) In sEH knockout Mäusen konnte die sEH weder in den Peroxisomen noch im Zytosol detektiert werden. Wenige Goldmarkierungen waren in den Mitochondrien zu erkennen.

### 3.7.4 Stammspezifische Unterschiede der sEH Aktivität in der Ratte

#### Kapitelübersicht:

Ziel dieser Untersuchungen war es, einen Beitrag zur Aufklärung von Zusammenhängen zwischen Herzinsuffizienz bei SHHF Ratten und der sEH Aktivität zu leisten.

Die Hydrolaseaktivität der Nieren (nur WKY und SHHF) und Herzen (WKY, SHRSP, SHHF, F2-Generation SHHFxSHRSP) wurde mit 14,15-EET als Substrat getestet. [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertes 14,15-EET wurde mit der zytosolischen Fraktion der Organe umgesetzt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Umsätze wurden extrahiert, mittels RP-HPLC getrennt und die Peakflächen mit der Shimadzu Class-VP Software integriert.

In den Nieren der Rattenstämme WKY und SHHF und den Herzen der Stämme SHRSP, WKY und SHHF wurden signifikante Unterschiede in der Hydrolaseaktivität festgestellt. Anhand von Segregationspopulationen der Stämme SHRSP und SHHF und einer anschließenden Linkage Analyse konnte der Phänotyp des SHHF Stammes, der sich durch Herzversagen auszeichnet, mit erhöhten Hydrolaseaktivitäten assoziiert werden (Abbildung 3-39).

In der Arbeitsgruppe von Dr. Norbert Hübner (MDC Berlin) wurden zwei nah verwandte Rattenstämme, SHHF (spontaneously hypertensive heart failure rats) und SHRSP (spontaneously hypertensive rats, stroke-prone) untersucht. Beide Stämme entwickeln essentiellen Bluthochdruck und linksventrikuläre Hypertrophie. Im Gegensatz zu SHRSP geht dies bei SHHF jedoch mit Herzversagen einher. Für eine Linkage Analyse des hämodynamischen Phänotyps und eines genomweiten Expressionsprofils wurden zwei Segregationspopulationen erstellt:

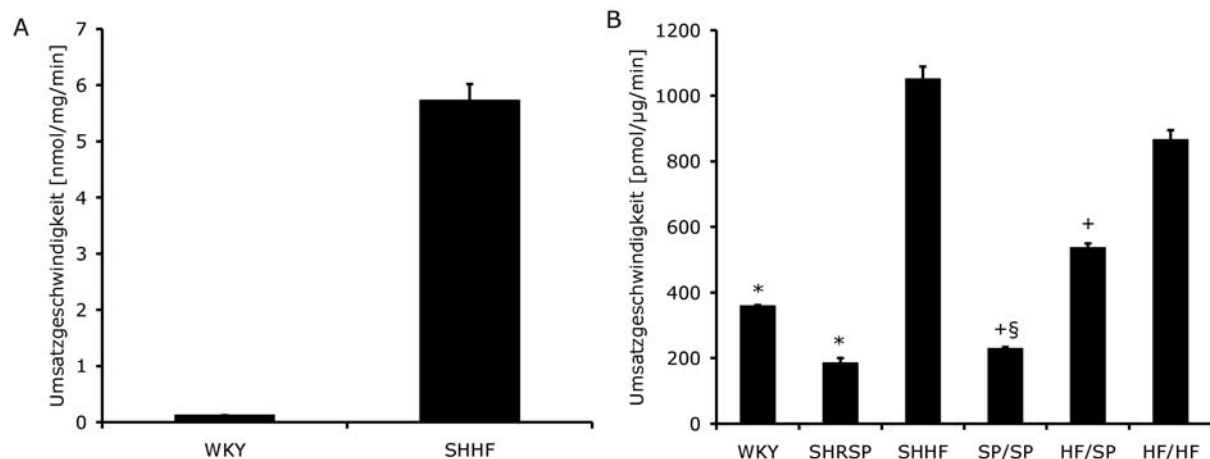
- F2-Generation aus einer Kreuzung von SHHF mit SHRSP
- F2-Generation aus einer Kreuzung von SHHF und WKY (Wistar-Kyoto Ratten, normotensiv)

Die Linkage Analyse identifizierte die sEH als Gen, das im Verdacht steht, Herzversagen zu verursachen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Korrelation zwischen der kardialen Ejektionsfraktion (EF) und der Expressionshöhe der sEH bestand: Tiere mit hoher EF wiesen eine niedrige, Tiere mit niedriger EF eine hohe sEH Expression auf. Eine Sequenzanalyse des Promotorbereiches der sEH zeigte einen Polymorphismus in der AP-1 Bindungsstelle, der zu einer verstärkten Promotoraktivität in SHHF gegenüber SHRSP und WKY führte.

In Zusammenarbeit mit uns wurden die verschiedenen Rattenstämme und eine F2-Generation (SHHFxSHRSP) auf ihre sEH Aktivität untersucht.

Die Hydrolaseaktivität variierte stark zwischen den unterschiedlichen Rattenstämmen: In der Niere zeigten WKY eine Aktivität von  $0,11 \pm 0,04$  nmol/mg/min während SHHF eine 50fach höhere Aktivität von  $5,71 \pm 1,1$  nmol/mg/min zeigten (Abbildung 3-39A).

Im Herzen von WKY lag die sEH Aktivität bei  $325 \pm 63$  pmol/mg/min, SHRSP hatten eine Aktivität von  $183 \pm 17$  pmol/mg/min und SHHF von  $743 \pm 32$  pmol/mg/min. Die Hydrolaseaktivität der Tiere der F2-Generation homzygot für das SHRSP-Allel (SP) der sEH war  $227 \pm 43$  und die der Homozygoten für das SHHF-Allel (HF) war  $864 \pm 195$  nmol/mg/min. Heterozygote Tiere (HF/SP) hatten eine Hydrolaseaktivität von  $535 \pm 96$  nmol/mg/min (Abbildung 3-39B).



**Abbildung 3-39: Stammspezifische Unterschiede in der sEH Aktivität der Niere (A) und stamm- und allel-spezifische Unterschiede in der sEH Aktivität im Herzen (B).**

(A) Die sEH Aktivität der Niere männlicher WKY und SHHF Ratten wurde in Standardreaktionen (50  $\mu$ l) mit 10  $\mu$ M 14,15-EET, 40 bzw. 5  $\mu$ g Protein (100.000  $\times$  g Überstand) und 1 Minuten Inkubationszeit ermittelt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3 pro Gruppe). SHHF zeigten eine höhere Hydrolaseaktivität als WKY.

(B) Die sEH Aktivität im Herzen männlicher Ratten der Stämme WKY, SHRSP und SHHF, sowie die der F2-Generation (SHHF $\times$ SHRSP) wurde in Standardreaktionen (50  $\mu$ l) mit 10  $\mu$ M 14,15-EET, 15  $\mu$ g Protein (10.000  $\times$  g Überstand) und 1 Minuten Inkubationszeit ermittelt (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 bei den Tieren der Parentalgeneration, n=10 bei den Tieren der F2-Generation). Die Stämme zeigten folgende signifikante Unterschiede: WKY und SHRSP vs. SHHF (\*,  $P < 0,05$ ), SP/SP und HF/SP vs. HF/HF (+,  $P < 0,001$ ) und SP/SP vs. HF/SP (§,  $P < 0,001$ ).

### 3.7.5 Hydrolyse von $\omega$ -3 Epoxy-Fettsäuren durch rekombinante lösliche Epoxidhydrolase

#### Kapitelübersicht:

Aus der Literatur war bekannt, dass die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) die aus AA gebildeten Epoxide, 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET hydrolysiert [90]. Zudem war bekannt, dass 14,15-EET und 11,12-EET durch die sEH der Maus stereoselektiv

hydrolysiert werden: so wird bei 14,15-EET das R,S Enantiomer und bei 11,12-EET das S,R Enantiomer mit größerer katalytischer Effizienz metabolisiert [65, 66].

In dieser Arbeit wurde die sEH katalysierte Hydrolyse der aus den  $\omega$ -3 PUFA EPA und DHA gebildeten  $\omega$ -3 Epoxiden 17,18-EETeTr und 19,20-EDP mit der Hydrolyse von 11,12-EET und 14,15-EET verglichen und die Kinetik der sEH-Enzyme von Mensch, Ratte und Maus bei der Umsetzung der Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP bestimmt.

Für die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeiten der gereinigten rekombinanten sEH-Enzyme aus Maus, Ratte und Mensch für die racemischen Gemische von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP wurden 10  $\mu$ M des  $1\text{-}^{14}\text{C}$  markierten Substrates in BSA-haltigem Puffer mit 0,02 ng/ $\mu$ l rekombinantes sEH Enzym für 10 Minuten inkubiert. Für die Analyse der Enzymkinetik der sEH für die Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP wurden 5-6 Substratkonzentrationen zwischen 1 und 250  $\mu$ M gewählt und für 3 Minuten mit Enzymkonzentrationen zwischen 0,1 und 4 ng/ $\mu$ l inkubiert (vgl. Abschnitt 2.6.3 in Material und Methoden). Die Assays wurden nach anschließender Extraktion mittels RP-HPLC getrennt, die Peakflächen mit der Shimadzu Class-VP Software integriert und gegebenenfalls mit dem Enzymkinetik-Modul von SigmaPlot 7 (SPSS) analysiert.

Gereinigte rekombinante sEH-Enzyme aus Mensch, Ratte und Maus wurden auf die Stereoselektivität ihrer Hydrolyse der aus EPA und DHA gebildeten  $\omega$ -3 Epoxide untersucht. Alle drei Enzyme katalysierten bevorzugt die Hydrolyse des R,S Enantiomers von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP. Die katalytische Effizienz aller untersuchten sEH-Enzyme war gegenüber 17(R),18(S)-EETeTr 8-fach höher als gegenüber dem S,R Enantiomer. Für 19,20-EDP war die Stereoselektivität nur bei der sEH der Maus mit einer 10-fachen katalytischen Effizienz gegenüber dem R,S Enantiomer stark ausgeprägt. Bei der sEH der Ratte (2-fach) und des Menschen (1,5-fach) nahm die Stereoselektivität im Vergleich zu 17,18-EETeTr ab.

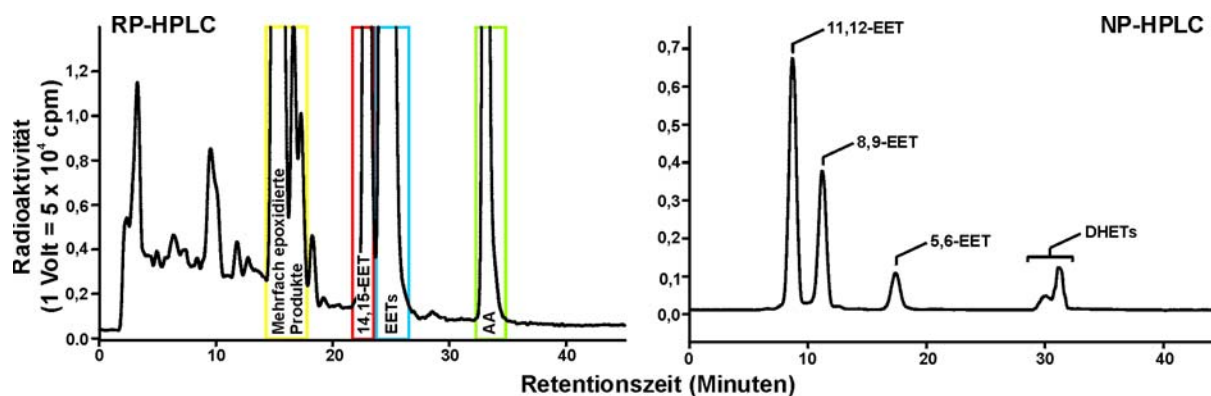
#### 3.7.5.1 Chemische Synthese von AA-, EPA- und DHA-Epoxiden

Aus  $1\text{-}^{14}\text{C}$  markierter AA, EPA und DHA wurden durch chemische Synthese die korrespondierenden regio- und stereoisomeren Epoxide hergestellt. Die Epoxide

wurden mittels RP- und NP-HPLC in die Regioisomere und mittels CP-HPLC in die Enantiomere getrennt.

### Synthese regioisomerer EETs

Die chemische Oxidation von AA führte zu allen vier möglichen Regioisomeren: 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET. Mittels RP-HPLC konnte racemisches 14,15-EET bei einer Retentionszeit von 23,5 Minuten und ein Gemisch der drei anderen racemischen Epoxide (24,5 bis 25,5 Minuten) gewonnen werden (Abbildung 3-40A). Durch weitere Trennung des Epoxidgemisches mit NP-HPLC konnten die anderen racemischen Epoxide gewonnen werden: 8,9-EET (~12 Minuten), 11,12-EET (~8 Minuten) und 5,6-EET (~17 Minuten; Abbildung 3-40B). Für eine Optimierung der Synthese wurde die Zugabe von CPB so eingestellt, dass das ein möglichst großer Anteil einfach und eine möglichst kleiner Anteil mehrfacher epoxidierter PUFAs entstand. Für die einzelnen Epoxide erbrachte die optimierte Synthese prozentuale Ausbeuten zwischen 3 und 8 %.



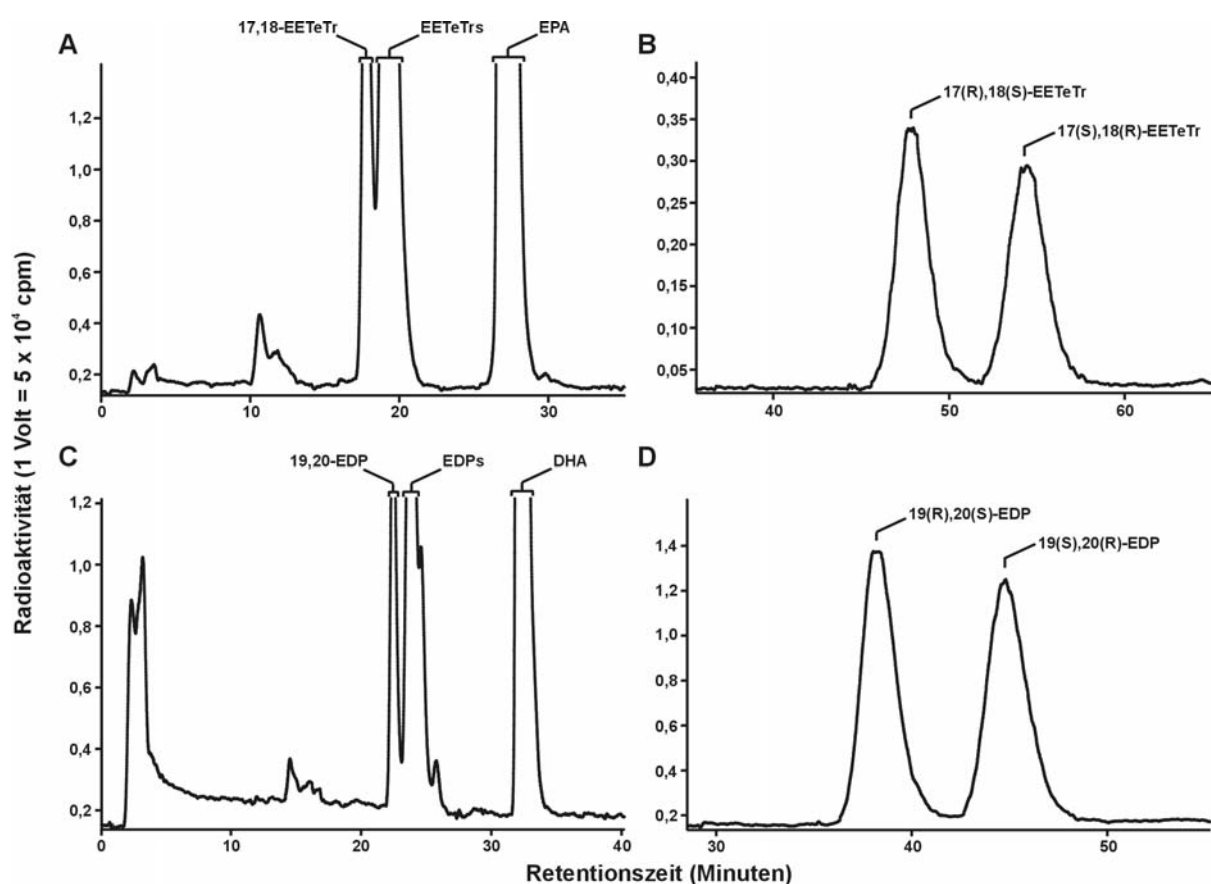
**Abbildung 3-40: Trennung der Synthese racemischer EETs mittels RP-HPLC (A) und NP-HPLC (B).**

(A) Repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm einer chemischen Oxidation von AA. In der RP-HPLC ist die Trennung von 14,15-EET (23,5 Minuten) von einem Gemisch der übrigen regioisomeren EETs (24,5 bis 25,5 Minuten). Mehrfach oxidierte EETs eluierten zwischen 15 und 18 Minuten, nicht epoxidierte AA bei 33 Minuten.

(B) Mit NP-HPLC erfolgte die Trennung der EET Fraktion, die aus der RP-HPLC zwischen 24,5 und 25,5 Minuten aufgefangen wurde. Die regioisomeren EET eluierten in der Reihenfolge 11,12-EET, 8,9-EET und 5,6-EET.

## Synthese regio- und stereoisomerer $\omega$ -3 Epoxide

Analog zur EET Synthese aus AA wurde die Synthese von 17,18-EETeTr aus EPA und 19,20-EDP aus DHA durchgeführt. Racemisches 17,18-EETeTr und 19,20-EDP konnte von den übrigen Regioisomeren mittels RP-HPLC getrennt werden. 17,18-EETeTr eluierte mit einer Retentionszeit von 19,6 Minuten deutlich vor den anderen regioisomeren EETeTrs (20,5 bis 22 Minuten; Abbildung 3-41A). Auch die RP-HPLC Trennung von 19,20-EDP (22 Minuten Retentionszeit) von den anderen regioisomeren Epoxiden der DHA (23,5 bis 26 Minuten Retentionszeit) war erfolgreich (Abbildung 3-41C). So wie bei der optimierten EET Synthese lagen die Ausbeuten für diese Epoxide zwischen 3 und 8 %.



**Abbildung 3-41: Trennung synthetischer stereoisomerer Epoxide aus EPA und DHA mittels RP-HPLC (A und C) und CP-HPLC (B und D).**

(A): RP-HPLC Trennung von 17,18-EETeTr (19,6) von anderen regioisomeren EETeTrs (20,5 bis 22) und EPA (29 Minuten).

(C): RP-HPLC Trennung von 19,20-EDP (22) von anderen regioisomeren EDPs (23,5 bis 26) und DHA (32 Minuten).

Stereoisomeren Trennung von 17,18-EETeTr (B) und 19,20-EDP (D): das R,S Enantiomer eluierte vor dem S,R Enantiomer.

Bei der Enantiomerengewinnung mit CP-HPLC eluierten bei 17,18-EETeTr das R,S vor dem S,R Enantiomer. In Analogie zur Enantiomerentrennung von 17,18-EETeTr gingen wir bei 19,20-EDP ebenfalls von dieser Elutionsreihenfolge aus (Abbildung 3-41B und D).

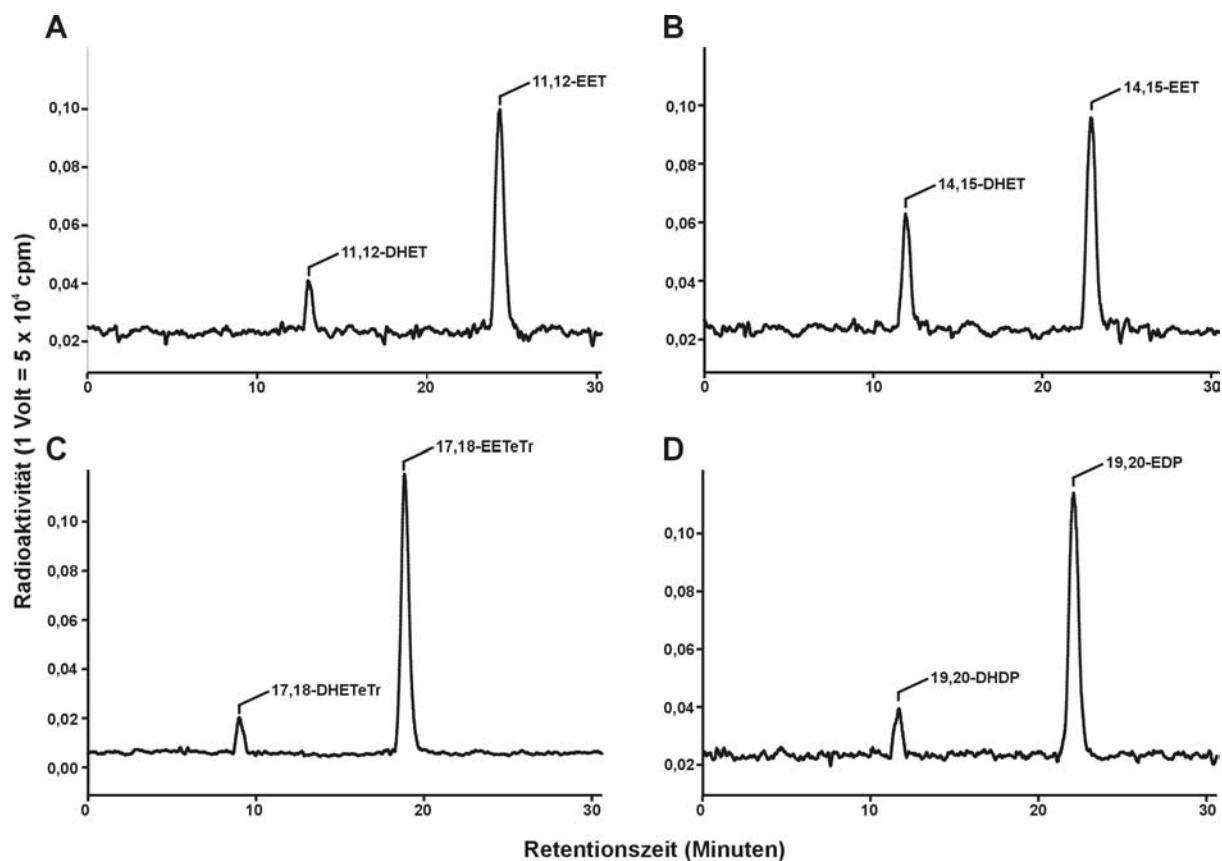
#### 3.7.5.2 *sEH katalysierte Hydrolyse racemischer Epoxide*

Die sEH-Enzyme aus Maus, Ratte und Mensch katalysierten die Hydrolyse der racemischen Gemische von 14,15-EET, 11,12-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP zu den korrespondierenden Dihydroxy-Verbindungen (14,15-DHET, 11,12-DHET, 17,18-DHETeTr, 19,20-DHDP). Außer diesen Primärprodukten entstanden keine weiteren Metabolite. In Abbildung 3-42 sind beispielhaft die Umsetzungen der vier Substrate durch die rekombinante gereinigte sEH der Maus gezeigt.

Alle drei sEH-Enzyme zeigten gegenüber 14,15-EET die höchste Umsatzgeschwindigkeit. Ein Vergleich der Enzyme untereinander zeigte, dass die sEH der Ratte am aktivsten gegenüber 14,15-EET war, gefolgt von der sEH der Maus mit ca. 60 % und der sEH des Menschen mit ca. 30 % der Aktivität der Ratte (Abbildung 3-43). Die Substrate 11,12-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP wurden mit ähnlichen Aktivitäten durch die drei Enzyme umgesetzt. Die sEH-Enzyme erreichten folgende Umsatzgeschwindigkeiten (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=3):

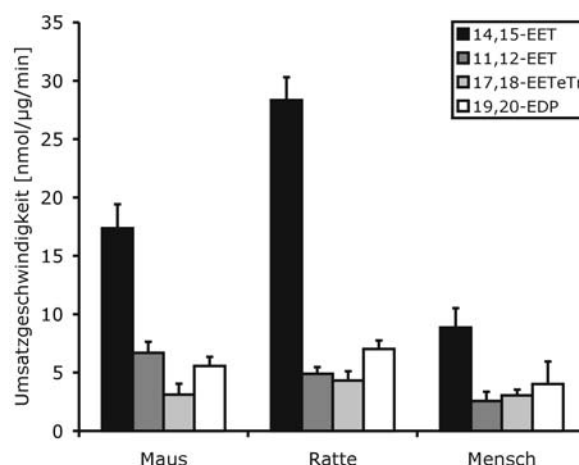
- sEH der Maus:  $17,4 \pm 2,1$  (14,15-EET),  $6,7 \pm 0,9$  (11,12-EET),  $3,1 \pm 0,9$  (17,18-EETeTr),  $5,6 \pm 0,8$  nmol/ $\mu$ g/min (19,20-EDP),
- sEH der Ratte:  $28,3 \pm 2,0$  (14,15-EET),  $4,9 \pm 0,6$  (11,12-EET),  $4,3 \pm 0,8$  (17,18-EETeTr),  $7,0 \pm 0,7$  nmol/ $\mu$ g/min (19,20-EDP),
- sEH des Menschen:  $8,9 \pm 1,7$  (14,15-EET),  $2,6 \pm 0,8$  (11,12-EET),  $3,1 \pm 0,5$  (17,18-EETeTr),  $4,0 \pm 1,9$  nmol/ $\mu$ g/min (19,20-EDP).





**Abbildung 3-42: Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme der sEH katalysierten Hydrolyse von 11,12-EET (A), 14,15-EET (B), 17,18-EETeTr (C) und 19,20-EDP (D).**

10  $\mu$ M Substrat, 0,02 g/ $\mu$ l sEH (Maus) und 10 Minuten Inkubationszeit ergaben Umsatzgeschwindigkeiten von (A)  $6,7 \pm 0,9$  (11,12-EET), (B)  $17,4 \pm 2,1$  (14,15-EET), (C)  $3,1 \pm 0,9$  (17,18-EETeTr) und (D)  $5,6 \pm 0,8$  nmol/ $\mu$ g/min (19,20-EDP). Bei keinem der Substrate war eine Spontanhydrolyse zu beobachten. Nach 60 Minuten Inkubationszeit waren die Epoxide vollständig in die korrespondierenden Dirole umgewandelt.

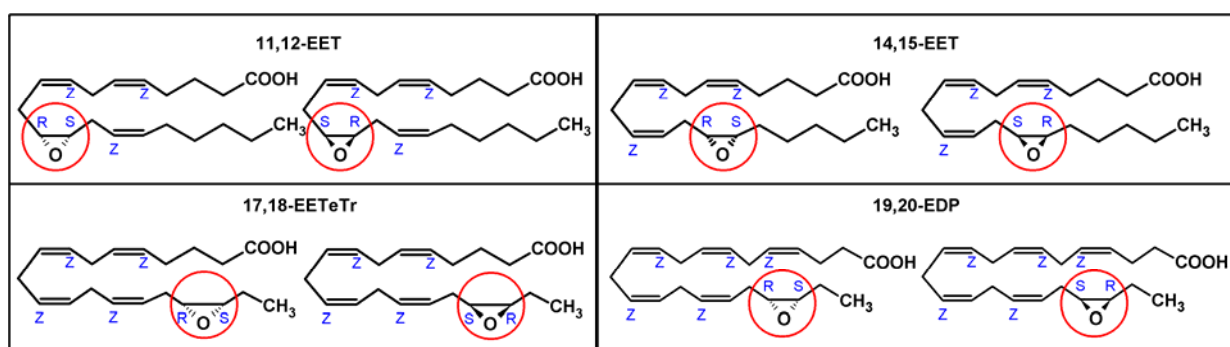


**Abbildung 3-43: Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten der sEH von Maus, Ratte und Mensch mit den racemischen Substraten 14,15-EET, 11,12-EET 17,18-EETeTr und 19,20-EDP.**

Die Umsatzgeschwindigkeiten wurden wie in Abbildung 3-42 ermittelt (Dreifachbestimmungen  $\pm$  Standardabweichung). Alle drei Enzyme favorisieren bei ihrer Hydrolyse 14,15-EET. 11,12-EET, 17,18-EET und 19,20-EDP werden mit ähnlichen Umsatzgeschwindigkeiten hydrolysiert.

### 3.7.5.3 Selektiver Abbau einzelner Enantiomere aus dem Racemat

Racemate bestehen zu gleichen Teilen aus ihren Enantiomeren. Die Enantiomere oder auch Stereoisomere von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP sind in Abbildung 3-45 dargestellt.

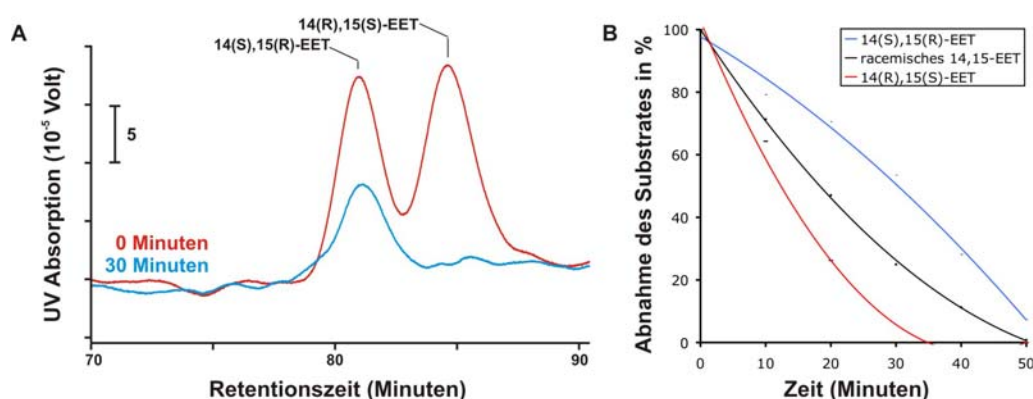


**Abbildung 3-44: Enantiomere von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP.**

Die am Epoxid beteiligten C-Atome sind chiral und können in der R,S oder S,R Konformation vorliegen. Die Enantiomere verhalten sich wie Spiegelbilder zueinander.

Unter Berücksichtigung der Zusammensetzung der Racemate aus zwei Enantiomeren stellt sich die Frage, ob die sEH-abhängige Hydrolyse des

racemischen Gemischs (vgl. Abschnitt 3.7.5.2) gleichwertig ist mit der der einzelnen Enantiomere. Zur Klärung dieser Frage wurde das Racemat von 14,15-EET durch die sEH der Maus umgesetzt und die Enantiomere mittels CP-HPLC analysiert. In Abbildung 3-45 ist die stereoselektive sEH-katalysierte Hydrolyse von racemischem 14,15-EET dargestellt. Dabei sind in den Chromatogrammen (Abbildung 3-45A) zwei Momentaufnahmen zu Beginn der Reaktion und nach 30 Minuten Inkubationszeit gezeigt. Der Abbau der einzelnen Enantiomere sowie des Racemats in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 3-45B dargestellt.



**Abbildung 3-45: Stereoselektive Hydrolyse von 14,15-EET durch die sEH der Maus.**

(A) CP-HPL Chromatogramm von racemischem 14,15-EET vor und nach einer sEH-katalysierten Hydrolyse. In 250  $\mu$ l wurden 10  $\mu$ M racemisches 14,15-EET mit 0,15 ng/ $\mu$ l sEH der Maus umgesetzt. Dem Ansatz wurde bei 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten ein Aliquot entnommen und mit CP-HPLC analysiert.

(B) Abbau der einzelnen Enantiomere sowie des Racemats in Abhängigkeit von der Zeit. Die Daten stammen von der Auswertung der CP-HPLC-Chromatogramme (vgl. A).

Eine Analyse der sEH-katalysierten Hydrolyse der einzelnen Enantiomere von 14,15-EET, 11,12-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP bestätigte dieses Ergebnis. So hydrolysierte die sEH der Maus 14(R),15(S)-EET, 11(S),12(R)-EET, 17(R),20(S)-EETeTr und 19(R),20(S)-EDP mit höherer katalytischer Effizienz als das jeweilig andere Enantiomer. Die Hydrolyse katalysiert von der sEH der Ratte bzw. der humanen sEH war ebenfalls stereoselektiv (vgl. Tabelle 3-5).

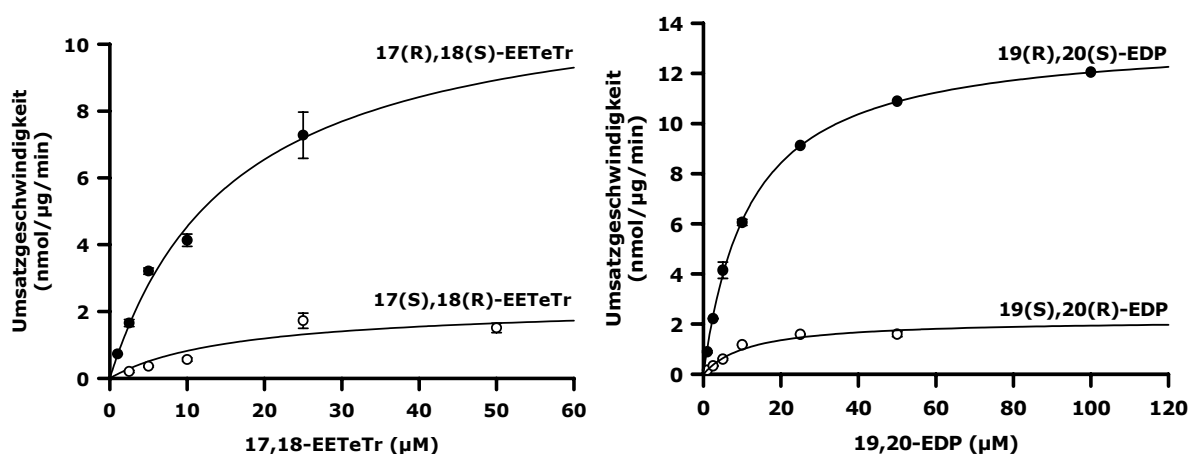
**Tabelle 3-5: Relative Umsätze der Enantiomere der unterschiedlichen Substrate.**

	Maus		Ratte		Mensch	
	R,S	S,R	R,S	S,R	R,S	S,R
14,15-EET	5	1	16	1	13	1
11,12-EET	1	4	1	1	1	3
17,18-EETeTr	6	1	4	1	3	1
19,20-EDP	9	1	4	1	6	1

Die Werte ergaben sich aus Bestimmungen der Hydrolaseaktivität bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ , einer Enzymkonzentration von 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Die Umsatzgeschwindigkeiten wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt.

#### 3.7.5.4 Kinetik der sEH katalysierten Hydrolyse der Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP

Die sEH katalysierte Hydrolyse der Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP folgt einer Michaelis-Menten Kinetik. In Abbildung 3-46 ist dies beispielhaft für die rekombinante gereinigte sEH der Maus dargestellt.



**Abbildung 3-46: Michaelis-Menten Kinetik der gereinigten rekombinanten sEH der Maus für 17(R),18(S)-EETeTr, 17(S),18(R)-EETeTr, 19(R),20(S)-EDP und 19(S),20(R)-EDP.**

Für die Analyse der Kinetik wurden in einem Standardansatz 5-6 Substratkonzentrationen (1 und 250  $\mu\text{M}$ ) von 17(R),18(S)-EETeTr mit 0,1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , von 17(S),18(R)-EETeTr mit 0,4  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 19(R),20(S)-EDP mit 0,33  $\text{ng}/\mu\text{l}$  und 19(S),20(R)-EDP mit 1,25  $\text{ng}/\mu\text{l}$  rekombinanter gereinigter sEH der Maus für 3 Minuten inkubiert. Die Analyse der Umsätze erfolgte mittels RP-HPLC (vgl. Abbildung 3-42) und den Softwares Class-VP und SigmaPlot. Die K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Werte der sEHs für diese Substrate sind in Tabelle 3-6 aufgelistet.

Dabei wurden 17(R),18(S)-EETeTr und 19(R),20(S)-EDP mit höherer katalytischer Effizienz metabolisiert als ihre entsprechenden S,R Enantiomere (V<sub>max</sub>- und K<sub>m</sub>-

Werte in Tabelle 3-6). Bei 17,18-EETeTr wurde das R,S Enantiomer von allen drei sEH-Enzymen 8-fach effektiver umgesetzt als das S,R Enantiomer. Bei 19,20-EDP war nur die sEH der Maus ähnlich stereoselektiv: das R,S Enantiomer wurde mit 11-facher katalytischer Effizienz umgesetzt. Bei der sEH der Ratte und der sEH des Menschen war der Unterschied mit Faktoren von 2,2 und 1,5 nicht so ausgeprägt.

**Tabelle 3-6: Enzymkinetik der gereinigten rekombinanten sEH aus Maus, Ratte und Mensch für die Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP.**

sEH	Enantiomere	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (nmol/μg/min)	V <sub>max</sub> / K <sub>m</sub>
Mouse	17(R),18(S)-EETeTr	15,4 ± 3,7	12,0 ± 1,4	0,8
	17(S),18(R)-EETeTr	22,0 ± 11,0	2,5 ± 0,6	0,1
	19(R),20(S)-EDP	12,0 ± 2,6	13,5 ± 1,9	1,1
	19(S),20(R)-EDP	21,1 ± 3,3	2,0 ± 0,1	0,1
Rat	17(R),18(S)-EETeTr	5,9 ± 1,9	4,7 ± 0,5	0,8
	17(S),18(R)-EETeTr	23,4 ± 8,8	2,5 ± 0,4	0,1
	19(R),20(S)-EDP	3,6 ± 0,8	9,4 ± 0,9	2,6
	19(S),20(R)-EDP	1,5 ± 1,0	1,9 ± 0,2	1,2
Human	17(R),18(S)-EETeTr	1,5 ± 0,7	1,2 ± 0,1	0,8
	17(S),18(R)-EETeTr	7,3 ± 3,1	0,6 ± 0,1	0,1
	19(R),20(S)-EDP	8,7 ± 2,4	5,3 ± 0,8	0,6
	19(S),20(R)-EDP	5,6 ± 2,2	0,7 ± 0,1	0,4

## 4 Diskussion

In den letzten Jahren wurde zunehmend erkannt, dass CYP-abhängige Eicosanoide wie 20-HETE und EETs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gefäß-, Nieren- und Herzfunktion spielen. Daher wird in verschiedenen Arbeitsgruppen und der Pharmaindustrie zurzeit intensiv daran gearbeitet, die CYP-abhängigen Signalwege als neues klinisches Target für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erschließen. Auf diesem Wege sind jedoch noch eine Vielzahl grundlegender Fragestellungen zu lösen. Dazu gehören (1.) die Identität der 20-HETE und EET bildenden CYP-Isoformen in den verschiedenen Organen und Geweben, (2.) die Natur der vermuteten CYP-Eicosanoid Rezeptoren und (3.) die Art der an der jeweiligen Signaltransduktion beteiligten Komponenten und Effektoren (Kinasen und Phosphatasen, sowie verschiedene Ionenkanäle). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Entwicklung neuer Pharmaka zur gezielten Beeinflussung der Biosynthese (CYP Inhibitoren) und Wirkung (20-HETE Antagonisten und EET Agonisten), sowie des Abbaus (sEH-Inhibitoren) von CYP-Eicosanoiden.

Zur Lösung dieser grundlegenden Fragestellungen sind Tiermodelle unerlässlich. Dabei bieten sich insbesondere Mausmodelle an, da in Mäusen die Expression der beteiligten Komponenten sowohl durch gezielte Genzerstörung (knockout Modelle) als auch durch Überexpression (transgene Modelle) spezifisch verändert werden kann. Für die Anwendung dieser Techniken besteht jedoch das Problem, dass der CYP-Eicosanoid Stoffwechsel gerade bei der Maus bisher relativ unerforscht ist. Dafür gibt es wahrscheinlich zwei Hauptursachen. Zum einen wurden Mäuse bisher weit weniger als Modell zur Analyse kardiovaskulärer Erkrankungen genutzt als Ratten. Zum anderen haben genomische Sequenzierungen gezeigt, dass sich die potentiell an der 20-HETE und EET Synthese beteiligten CYP-Familien bei Maus, Ratte und Mensch divergent entwickelt haben. Daraus resultiert das Problem der orthologen Gene, d.h. die Frage welche CYP-Gene in den verschiedenen Organismen die gleiche Funktion bei der Eicosanoid-Biosynthese ausüben. Die Beantwortung dieser Frage ist eine entscheidende Voraussetzung für die Etablierung geeigneter Mausmodelle zur genetischen Manipulation des CYP-abhängigen Eicosanoid-Stoffwechsels.

Ausgehend von dieser allgemeinen Fragestellung bestand das Hauptziel der vorliegenden Arbeit in der Identifizierung der 20-HETE Synthase in der Mausniere

und der Aufklärung ihrer enzymatischen Eigenschaften. Darüber hinaus sollten in Zusammenarbeit mit verschiedenen tierexperimentell arbeitenden Gruppen neue Möglichkeiten zur pharmakologischen Beeinflussung des CYP-Eicosanoid Stoffwechsels analysiert werden.

Im Ergebnis gelang es, Cyp4a12a als die 20-HETE Synthase der Mausniere zu identifizieren. Dazu wurde die Substrat- und Wirkungsspezifität dieser CYP-Isoform, sowie ihre organ- und geschlechtsspezifische Expression im Vergleich mit den anderen drei Cyp4a-Isoformen der Maus analysiert (zur Diskussion siehe Abschnitt 4.1). Ausgehend von diesem Befund konnte ein Mausmodell zur gewebespezifischen Überexpression von 20-HETE etabliert werden, mit dessen Hilfe es zukünftig möglich sein wird, die duale Rolle von 20-HETE bei der Blutdruckregulation aufzuklären (vgl. Ausblick 5).

Zur pharmakologischen Beeinflussung des CYP-Eicosanoid Stoffwechsels wurden eine Reihe viel versprechender Ergebnisse erzielt:

In Zusammenarbeit mit Kollegen von der Nephrologischen Klinik der Charité (Uwe Hoff, Duska Dragun) wurde in einem Rattenmodell gezeigt, dass die pharmakologische Hemmung der 20-HETE Bildung und Wirkung eine Schädigung der Niere durch Ischämie/Reperfusion verhindert. Hier könnten sich interessante neue Ansatzpunkte zur Prävention des akuten Nierenversagens bei Nierentransplantationen ergeben (vgl. Abschnitt 4.2.1).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Norbert Hübner (MDC) wurde gefunden, dass die sEH in verschiedenen Rattenstämmen unterschiedlich stark exprimiert wird und dass dies mit dem Krankheitsbild des Herzversagens assoziiert ist. Dieses und eine Reihe weiterer Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen lassen es aussichtsreich erscheinen, sEH Inhibitoren für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu entwickeln (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Weiterhin unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der gesamte CYP-Eicosanoid Stoffwechsel durch  $\omega$ -3 PUFAs beeinflusst werden kann. So wurde gezeigt, dass die 20-HETE Synthase der Maus EPA als effektives alternatives Substrat akzeptiert und neben der Hydroxylierungsreaktion dann auch eine Epoxidation der  $\omega$ -3 Doppelbindung katalysiert. Das entstehende Epoxid (17,18-EETeTr) wird durch die sEH stereoselektiv hydrolysiert. Da sich die AA und EPA

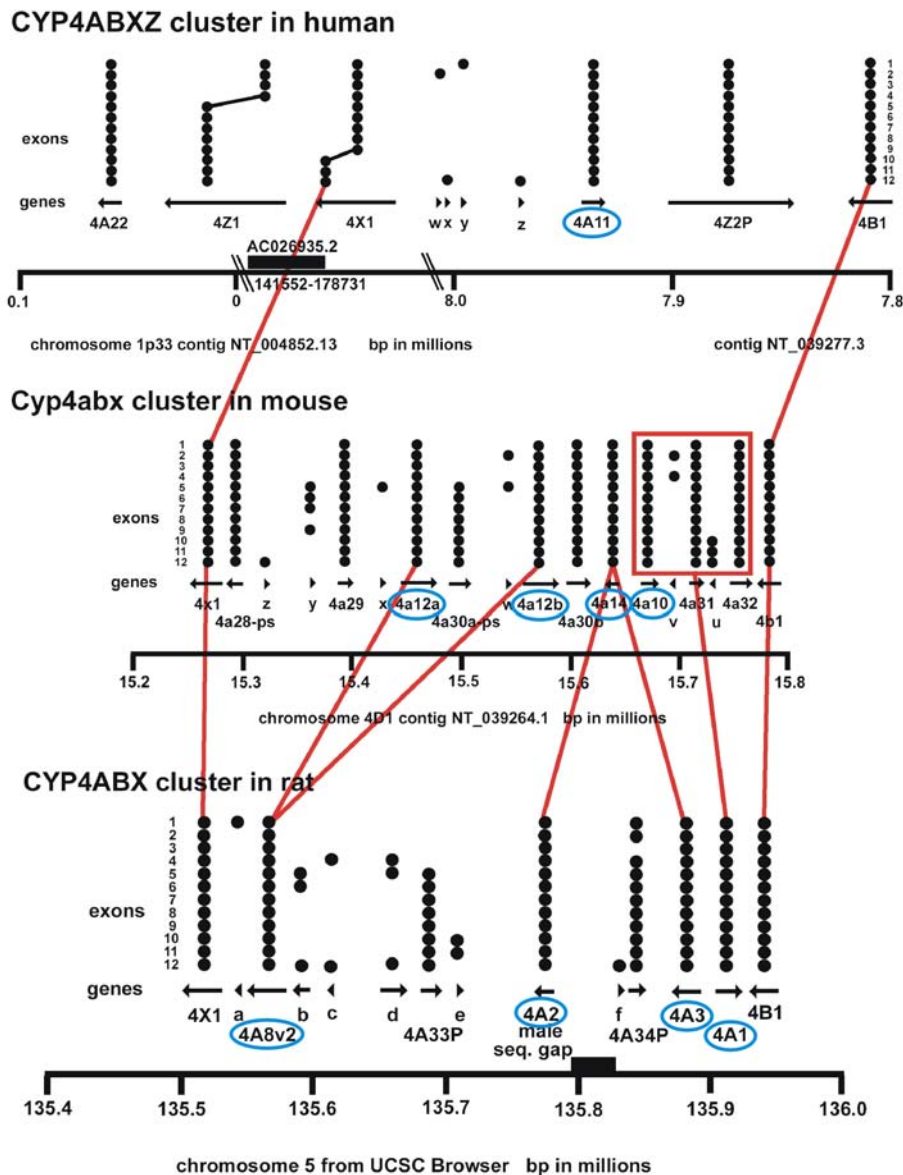
abgeleiteten Eicosanoide in ihrer physiologischen Wirkung unterscheiden (in Zusammenarbeit mit Gerd Wallukat, MDC und Maik Gollasch, Charité), ergeben sich aus diesen Befunden neue Ansatzpunkte zum Verständnis der kardioprotektiven Eigenschaften von  $\omega$ -3 PUFAs (vgl. Abschnitt 4.2.3).

#### **4.1 Identifizierung von Cyp4a12a als 20-HETE Synthase der Mausniere**

Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.2.5) beschrieben sind CYP-Isoformen der Subfamilien 4A und 4F die prinzipiellen Kandidaten für 20-HETE bildende Enzyme. Vorangehende Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass in der menschlichen Niere CYP4A11 und CYP4F2 für die 20-HETE Bildung verantwortlich sind [91]. Bei der Ratte ist CYP4A1 die aktivste 20-HETE Synthase, aber auch CYP4A2, Cyp4A3 und CYP4A8 tragen geschlechts- und organspezifisch zur Bildung von 20-HETE bei [13, 14]. Die Rolle der verschiedenen CYP4F-Isoformen, die ebenfalls in der Rattenniere exprimiert werden [92], ist noch weitgehend unklar, da sie zumeist nur eine geringe katalytische Aktivität bei der AA  $\omega$ -Hydroxylierung aufweisen [93]. Bei der Maus waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit drei Cyp4a-Isoformen bekannt: Cyp4a10, Cyp4a12 und Cyp4a14. Die enzymatischen Eigenschaften dieser Cyp4a-Isoformen waren jedoch unbekannt, so dass unklar war, welchen Anteil sie an der renalen 20-HETE Bildung haben.

Die bei der Identifizierung anderer Gene hilfreiche Methode der Suche nach orthologen Genen ist im Fall der CYP-Gene nur bedingt anwendbar. Wie in Abbildung 4-1 gezeigt, sind die CYP4A-Gene innerhalb der so genannten CYP4ABX cluster beim Menschen auf Chromosom 1, bei der Ratte auf Chromosom 5 und bei der Maus auf Chromosom 4 lokalisiert [9].





**Abbildung 4-1: CYP4ABX cluster von Mensch, Maus und Ratte ([9]; <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).**

Humanes CYP4ABX Cluster: Chromosom 1 mit zwei aneinander gefügten Abschnitten (indiziert durch den schwarzen Balken), Abschnitt 0,1 bis 0 und 8.0 bis 7,8 Millionen bp. Cyp4abx Cluster der Maus: Chromosom 4, Abschnitt 15,2 bis 15,8 Millionen bp. CYP4ABX Cluster der Ratte: Chromosom 5, Abschnitt 135,4 bis 136,0 Millionen bp. Punkte indizieren die Anzahl der Exons, Pfeile die Lesrichtung der Gene, ps steht für Pseudogen. Blau umrandet sind die Gene von Interesse. Die roten Verbindungslinien weisen auf hohe Sequenzhomologien hin.

Im Menschen gibt es zwei CYP4A-Gene, von denen nur CYP4A11 für ein funktionelles Enzym kodiert [10]. In der Ratte liegen 4 CYP4A-Gene vor, die alle für aktive Enzyme kodieren [13, 14]. Die Analyse des Mausgenoms hat gezeigt, dass es neben Cyp4a10 und Cyp4a14 zwei Varianten des Cyp4a12-Gens gibt (Cyp4a12a und Cyp4a12b), die durch eine Tandemduplikation innerhalb des Cyp4abx clusters

entstanden sind (vgl. Abbildung 4-1). Darüber hinaus schlägt die genomische Sequenzierung die Existenz von 4 weiteren Cyp4a-Genen vor (Cyp4a29, Cyp4a30b, Cyp4a31 und Cyp4a32), für deren Expression es aber bisher keine Hinweise gibt. Hinzu kommt, dass Cyp4a30b und Cyp4a32 eine äußerst niedrige Homologie von <70 zu allen anderen CYP4A-Isoformen aufweisen und Cyp4a31 aufgrund der fehlenden Häm-bindenden Sequenz vermutlich kein funktionelles Enzym ist. Cyp4a29 weist eine Homologie von 96 % zu Cyp4a10 auf. Vermutlich liegt hier, wie auch bei den Cyp4a12-Isoformen, eine Genduplikation vor. Cyp4a29 könnte daher ähnliche enzymatische Eigenschaften wie Cyp4a10 zeigen, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Unter den Maus Cyp4a-Isoformen weist Cyp4a10 mit 92 % die größten Sequenzübereinstimmungen zum CYP4A1, der aktivsten CYP4A AA-Hydroxylase der Ratte auf (siehe Tabelle 4-1) [14]. Cyp4a12a und Cyp4a12b sind CYP4A8 am ähnlichsten, das nur eine geringe AA-Hydroxylaseaktivität aufweist [13]. Cyp4a14 ähnelt CYP4A2 und CYP4A3, die neben ihrer Hydroxylaseaktivität auch eine Epoxygenaseaktivität aufweisen [14, 15]. Die Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Maus Cyp4a-Isoformen und CYP4A11 liegt zwischen 72 % und 78 %, und ist damit relativ gering ausgeprägt. Die größte Homologie liegt aber auch hier zwischen CYP4A11 und Cyp4a10 vor. Die Sequenzhomologien sind im CYP4ABX cluster in Abbildung 4-1 durch rote Linien gekennzeichnet.

**Tabelle 4-1: Homologien in der Aminosäuresequenzen von CYP4A-Isoformen.**

CYP (Länge)	4a10 (509)	4a12a (508)	4a12b (508)	4a14 (507)	4A11 (519)
4A1 (509)	91,75	78,35	78,54	71,20	77,41
4A2 (504)	72,42	71,63	72,02	88,29	73,81
4A3 (507)	72,39	71,20	71,60	89,35	73,57
4A8 (508)	76,18	86,81	87,80	71,01	75,98
4A11 (519)	77,60	76,97	77,56	72,98	

Die für den Aminosäurevergleich verwendeten Sequenzen waren: Cyp4a10 (BAB22165), Cyp4a12a (NP\_031847), Cyp4a12b (NP\_758510), Cyp4a14 (NP\_031848), CYP4A1 (P08516), CYP4A2 (A32965), CYP4A3 (P20817), CYP4A8 (P24464) und CYP4A11 (NP\_000769).

Ausgehend von diesen Sequenzbetrachtungen konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b und Cyp4a14 als prinzipielle Kandidaten für die 20-HETE Synthase der Mausniere.

Die hohe Sequenzhomologie zwischen CYP4A1 und Cyp4a10 legt nahe, dass Cyp4a10 für die 20-HETE Bildung in der Mausniere verantwortlich ist. Ergebnis dieser Arbeit ist jedoch, dass nicht Cyp4a10, sondern Cyp4a12a die 20-HETE Synthase der Maus ist. Diese Aussage wird durch vier Ergebnisse gestützt, die diese Arbeit erbracht hat:

1. Von den vier Cyp4a-Isoformen sind nur Cyp4a12a und Cyp4a12b in der Lage, AA zu 20-HETE zu hydroxylieren und nur Cyp4a12a ist signifikant in der Niere exprimiert (4.1.1).
2. Das Produktmuster von renalen mikrosomalen AA und EPA Umsätzen entspricht dem von Cyp4a12a (4.1.2).
3. Die geschlechtsspezifische 20-HETE Bildung entspricht der Expression von Cyp4a12a (4.1.3).
4. Androgene induzieren in der Niere die Expression von Cyp4a12a und die 20-HETE Bildung (4.1.4).

#### 4.1.1 Cyp4a12a ist von den in der Niere exprimierten Isoformen die einzige 20-HETE Synthase.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine umfangreiche Analyse der enzymatischen Eigenschaften der vier CYP4A-Isoformen der Maus durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle vier Enzyme hoch aktive LA Hydroxylasen sind, jedoch nur die beiden Cyp4a12-Isoformen, nicht aber Cyp4a10 und Cyp4a14, AA und EPA metabolisieren. AA wird mit hoher Regioselektivität sowohl von Cyp4a12a (90 % des Gesamtproduktes) als auch von Cyp4a12b (80 % des Gesamtproduktes) zu 20-HETE hydroxyliert und nur zu einem geringen Teil zu 19-HETE (Cyp4a12a) bzw. 19- und 18-HETE (Cyp4a12b). EPA wird von Cyp4a12a und Cyp4a12b nicht nur zu 19- und 20-HEPE hydroxyliert, sondern auch zu einem erheblichen Teil zu 17,18-EETeTr epoxidiert.

**Cyp4a10** ist die CYP-Isoform der Maus mit der höchsten Homologie zum CYP4A1 (s.o.). Wie in Abschnitt 3.1.3.2 dargestellt, weist Cyp4a10 nur eine sehr geringe AA-Hydroxylase Aktivität auf. Unter der Annahme, dass 10 µM eine physiologisch sinnvolle AA Konzentration ist, wäre die Aktivität von Cyp4a10 ca. 70-fach kleiner als die von Cyp4a12a. Auch eine Cyp4a10-Genzerstörung in der Maus verändert die AA-

Hydroxylaseaktivitäten der Niere nicht [22]. Zusammengenommen bestätigt dies, dass Cyp4a10 nicht zur 20-HETE Bildung beiträgt.

**Cyp4a14** ist am ähnlichsten mit CYP4A2 und CYP4A3, die in den Nieren männlicher Ratten hoch exprimiert sind und eine signifikante 20-HETE Synthase Aktivität zeigen [14, 15]. Im Gegensatz dazu zeigt Cyp4a14 eine Weibchen-spezifische Expression und keinerlei 20-HETE Synthase Aktivität.

Beide **Cyp4a12**-Gene [9] sind funktionell aktiv, besitzen jedoch unterschiedliche gewebespezifische Expression (vgl. Abschnitt 3.2.1) und nur Cyp4a12a wird signifikant in der Niere exprimiert. Die Aminosäuresequenzen von Cyp4a12a und Cyp4a12b unterscheiden sich lediglich in 11 Aminosäurepositionen. Betrachtet man diesen hohen Grad an Homologie sind die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Varianten erstaunlich. Im Gegensatz zu Cyp4a12a zeigte Cyp4a12b

- i. keine Präferenz für die  $\omega$ - gegenüber der ( $\omega$ -1)-Hydroxylierung von LA,
- ii. eine geringere Regioselektivität bei der Hydroxylierung von AA,
- iii. keine Stereoselektivität bei der Epoxidation der 17,18-Doppelbindung von EPA und
- iv. ein größeres Epoxygenase/Hydroxylase Verhältnis bei Umsätzen von EPA.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Positionierung des Substrates im katalytischen Zentrum bei Cyp4a12b vermutlich nicht so strikt ist wie bei Cyp4a12a. Welche Aminosäuren genau dafür verantwortlich sind, wird derzeit durch ortsspezifische Mutagenese im Labor von Dr. W.-H. Schunck durch eine Diplomandin (Katharina Frindte) untersucht. Auch im Menschen (CYP4A11 und CYP4A22; [10, 94]) und in der Ratte (CYP4A2 und CYP4A3 [13, 14]) gibt es hoch-homologe CYP4A-Enzyme. Die Sequenzunterschiede in diesen CYP Paaren betreffen jedoch andere Aminosäurepositionen und haben andere funktionelle Konsequenzen. Daher ist die generelle Bedeutung der CYP4A-Genduplikation und die anschließende Entwicklung der Genvarianten nicht offensichtlich und könnte in Mensch, Ratte und Maus unterschiedlich sein.

Cyp4a12a hydroxylierte AA nicht nur zu 20-HETE, sondern katalysierte auch die folgende Oxidation von 20-HETE zu 20-COOH-AA. Diese Reaktion könnte dazu dienen, die vasokonstriktiven Eigenschaften von 20-HETE aufzuheben [95, 96]. 20-COOH-AA besitzt auch physiologische Bedeutung, da es in der Niere den  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -

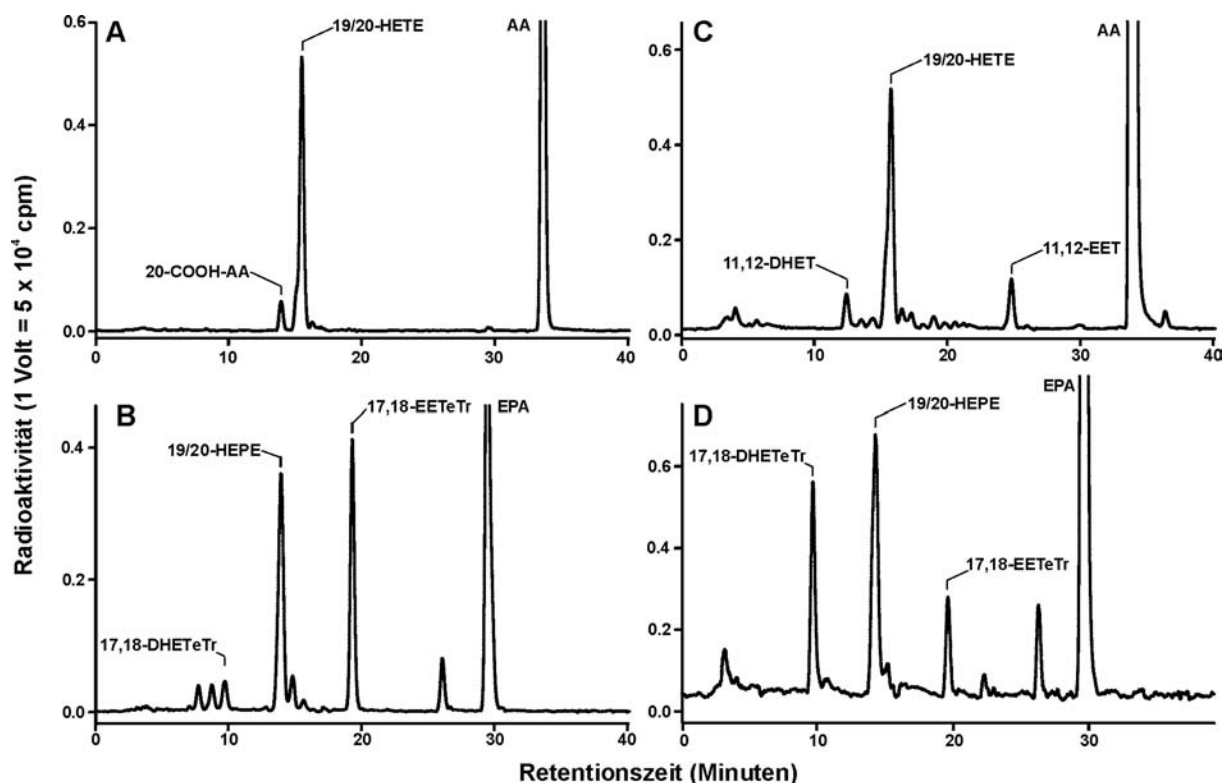
2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter inhibiert [42, 95] und ein Aktivator von PPAR-Rezeptoren ist [97]. Die Fähigkeit, eine Oxidationskaskade von einer Fettsäure zur korrespondierenden Dicarbonsäure zu katalysieren, wurde schon früher für verschiedene CYP-Enzyme mit anderen Substraten als AA gezeigt [98]. So katalysieren auch Cyp4a10 und Cyp4a14 die weitere Oxidation von 12-OH-LA, aber nicht von 20-HETE.

Um den Befund weiter abzusichern, dass nur die Cyp4a12 Varianten, aber nicht Cyp4a10 und Cyp4a14 zur 20-HETE Bildung in der Lage sind, wurde der Einfluss von Cyt b5 untersucht. Cyt b5 kann sich positiv auf die katalytische Effektivität von CYP-Enzymen auswirken, indem es den Elektronentransfer zum CYP Protein verbessert [99]. Loughran et al. [100] zeigten zudem, dass eine Zugabe von Cyt b5 bei CYP4A7 aus Kaninchen eine Konformationsänderung hervorruft, die eine AA Hydroxylierung ermöglicht. Bei den hier untersuchten Isoformen (mit Ausnahme von Cyp4a14) hatte Cyt b5 einen positiven Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme. Dies weist auf einen verbesserten Elektronentransfer hin. Es wurde jedoch keine Änderung der Substratspezifität beobachtet, so dass auch mit Cyt b5 weder Cyp4a10 zu einer verbesserten, noch Cyp4a14 generell zu einer AA Hydroxylierung in der Lage waren.

#### 4.1.2 Das AA und EPA Metabolitenprofil von Nierenmikrosomen stimmt mit dem von Cyp4a12a überein

Vergleicht man das Profil der aus AA durch Nierenmikrosomen gebildeten Metabolite mit dem AA Metabolitenprofil von Cyp4a12a, so erkennt man eine weitgehende Übereinstimmung der Produktbildung (Abbildung 4-2C und A). Deutlicher noch kann man diese Übereinstimmungen bei dem Produktprofil von EPA erkennen, in dem sowohl bei Nierenmikrosomen als auch bei Cyp4a12a 19-/20-HEPE und 17,18-EETeTr als Hauptprodukte auftreten. 17,18-EETeTr wird zu 17,18-DHETeTr hydrolysiert, so dass die Summe der Peaks von 17,18-EETeTr und 17,18-DHETeTr die Gesamtmenge des Epoxidationsproduktes ergibt (Abbildung 4-2D und B).

Diese signifikanten Übereinstimmungen der Produktmuster weisen auf eine herausragende Rolle von Cyp4a12a im Metabolismus von AA und EPA in der Maus hin. Zusätzliche Epoxy-Produkte beim Metabolismus von AA durch Nierenmikrosomen stammen vermutlich von CYP-Enzymen der Subfamilie 2C [101].



**Abbildung 4-2: Vergleich des AA und EPA Metabolitenprofils von Cyp4a12a und Nierenmikrosomen männlicher NMRI Mäuse.**

#### 4.1.3 Die geschlechtsspezifische 20-HETE Bildung stimmt mit der Cyp4a12a Expression überein.

Die Genexpression der Cyp4a-Isoformen der Maus in der Niere ist geschlechtsspezifisch. Dies konnte auf mRNA Ebene mit Hilfe von Taq-Man-RT-PCR übereinstimmend mit früheren Berichten [20, 21, 102] in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Das Expressionsprofil der Cyp4a-Isoformen wurde in fünf Mausstämmen (NMRI, FVB/N, 129Sv/J, BALB/c und C57BL/6) ermittelt und ergab eine hohe Expression von Cyp4a10 in beiden Geschlechtern, von Cyp4a12a spezifisch in männlichen und von Cyp4a14 spezifisch in weiblichen Tieren. Die Isoform Cyp4a12b konnte nur in weiblichen Sv129J und weiblichen und männlichen C57BL/6 Tieren detektiert werden und lag auch bei diesen Gruppen an der Nachweisgrenze. Die ausgeprägte geschlechtsspezifische Expression von Cyp4a12a wurde auch auf Proteinebene mit einem peptidspezifischen Antikörper in Westernblotanalysen nachgewiesen.

Parallel wurde in den fünf Mausstämmen die Kapazität zur 20-HETE Bildung untersucht. Diese lag in allen Stämmen bei den Männchen weit über der Aktivität der Weibchen und korrelierte mit dem Expressionsprofil von Cyp4a12a. Deutlich zu erkennen ist dies in Tabelle 4-2, in der das Verhältnis der 20-HETE Bildung bei Männchen und Weibchen der Expression von Cyp4a10, Cyp4a12a und Cyp4a14 gegenüber gestellt ist. Die höhere 20-HETE Bildung in Männchen kann nur durch die stärkere Expression von Cyp4a12a in Männchen erklärt werden. Cyp4a10 ist tendenziell und Cyp4a14 deutlich stärker in Weibchen exprimiert.

**Tabelle 4-2: Vergleich der 20-HETE Bildung mit der Expression von Cyp4a10, Cyp4a12a und Cyp4a14.**

Mausstamm	20-HETE Bildung (Männchen : Weibchen)	Expression der Isoform (Männchen : Weibchen)		
		Cyp4a10	Cyp4a12a	Cyp4a14
NMRI	4,7 : 1	1:4,0	37 : 1	1:37
FVB/N	2,0 : 1	1:2,6	165 : 1	1:42
129Sv/J	3,5 : 1	1:1,4	48 : 1	1:18
BALB/c	2,2 : 1	1:2,0	7 : 1	1:25
C57BL/6	1,6 : 1	1:1,1	60 : 1	1:12

Die Werte für die 20-HETE Bildung sind aus den Umsätzen von AA abgeleitet und für die Expression der Isoformen aus den Taq-Man-RT-PCR Ergebnissen (vgl. Ergebnisse 3.2.1). Hier werden nur die Männchen und Weibchen eines Stammes miteinander verglichen, wobei der jeweils niedrigere Wert gleich 1 gesetzt wurde. Für einen Vergleich der absoluten Expression siehe Abbildung 3-17.

Das Verhältnis der Cyp4a12b Expression in den Nieren männlicher C57BL/6 zu der Expression in den Nieren weiblicher C57BL/6 betrug 0,83:1. Da die Expression von Cyp4a12b äußerst gering war, scheint diese Isoform keinen Beitrag zur 20-HETE Bildung in der Niere zu leisten.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Cyp4a12a als die entscheidende 20-HETE Synthase in der männlichen Mausniere anzusehen ist. Offen bleibt dagegen die Frage, warum in der weiblichen Niere eine geringe, aber signifikante 20-HETE Bildung trotz des weitgehenden Fehlens von Cyp4a12a vorliegt. Dafür können zwei Möglichkeiten diskutiert werden: (i) die spezifische Aktivität von Cyp4a12a ist in weiblichen Nieren höher als in männlichen Tieren, z.B. durch die Anwesenheit von Cyt b5 oder (ii) die geschlechtsspezifische Expression einer bisher nicht charakterisierten 20-HETE bildenden Cyp-Isoform der Cyp4a- (z.B. Cyp4a29) oder Cyp4f-Subfamilie (eine der im Mausgenom vorliegenden 5 Cyp4f-Isoformen).

#### 4.1.4 Androgene induzieren in der Niere die Expression von Cyp4a12a und die 20-HETE Bildung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die renale 20-HETE Bildung bei Mäusen durch Androgene induziert werden kann. In Übereinstimmung mit der Rolle von Cyp4a12a als 20-HETE Synthase, korreliert die erhöhte AA-Hydroxylaseaktivität mit dem Anstieg der Cyp4a12a Expression auf Protein- und mRNA Ebene. Auf mRNA Ebene konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von Cyp4a12a in den Gefäßen gesteigert wird.

Vergleicht man die männlichen Tiere der verschiedenen Stämme, so sieht man klar, dass NMRI die Mäuse mit der höchsten Cyp4a12a Expression sind, während C57BL/6 Männchen keine signifikant höhere Cyp4a12a/20-HETE Expression besitzen als C57BL/6 Weibchen. Der Androgen-Effekt war in C57BL/6 Mäusen sehr viel stärker ausgeprägt als in NMRI Mäusen. Eine mögliche Erklärung sind die starken Unterschiede im Blut-Testosteronspiegel, die schon länger bekannt sind. C57BL/6 Mäuse gelten dabei als chronisch Testosteron-defizient [103]. Die Androgen-abhängige Expression erklärt auch die niedrigen Cyp4a12a Level der weiblichen Tiere aller Stämme. Die Unterschiede in der Cyp4a12a Expression auf mRNA und Proteinebene waren allerdings stärker ausgeprägt als die in der AA-Hydroxylaseaktivität (vgl. Abschnitt 3.2).

Die Androgen-Induzierbarkeit der 20-HETE Bildung scheint ein allgemeines Phänomen zu sein, das nicht nur in Mäusen, sondern auch in Ratten und möglicherweise auch beim Menschen auftritt. Dieses Phänomen ist insofern von besonderem Interesse, als es zu einem besseren Verständnis von Geschlechtsunterschieden bei der Ausprägung von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen könnte.

Ein weiteres Beispiel bei Mäusen liefern die Untersuchungen zur Entstehung von Bluthochdruck nach Ausschalten des Cyp4a14-Gens [20]. Cyp4a14 knockout Mäuse haben aus unbekannten Gründen erhöhte Androgen-Spiegel, die eine verstärkte renale 20-HETE Bildung hervorrufen, wahrscheinlich über eine Induktion von Cyp4a12a. Darüber hinaus ist es interessant festzustellen, dass weibliche Mäuse, die eine sehr niedrige 20-HETE Bildung haben, verglichen mit männlichen resistenter



gegenüber Ang II-induziertem Bluthochdruck [104] und gegenüber I/R-induziertem Nierenschaden [105] sind. C57BL/6 Männchen, die eine niedrigere 20-HETE Bildung in der Niere haben als Männchen anderer Stämme, zeigen verminderte Ansprechbarkeit bei der Entwicklung von DOCA-Salz Bluthochdruck [106], Glomerulosklerose [107] und Verletzungs-induzierter Neointima-Hyperplasie [108].

Auch in Ratten ist die Expression der CYP4A-Isoformen geschlechtsspezifisch [14, 16]. In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Lewisratten mit Androgenen behandelt. Dies führte zu einer signifikanten Steigerung der renalen 20-HETE Bildung. Aus der Literatur ist darüber hinaus bekannt, dass eine Androgenbehandlung von männlichen Ratten zu einer CYP4A8 Überexpression in den Nierengefäßen und zu Bluthochdruck führt [17]. Cyp4a12a teilt also mit CYP4A8 die Induzierbarkeit durch Androgene. Im Gegensatz zu den Geschlechtsunterschieden bei Mäusen gibt es bei Ratten in der Niere jedoch keine basalen geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Kapazität zur 20-HETE Bildung [17]. Zudem ist die Induktion in Weibchen stärker ausgeprägt als in Männchen, was vermutlich auf die verstärkte Expression von CYP4A2 zurückzuführen ist. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Adenovirus-vermittelte vaskuläre Überexpression einer einzelnen CYP4A-Isoform in Ratten direkt zu endothelialer Dysfunktion und Bluthochdruck führt [109].

Auch beim Menschen gibt es erste Hinweise auf eine Geschlechtsspezifität der 20-HETE Bildung. So ist der 20-HETE Spiegel im Serum bei Männern deutlich höher als bei Frauen [31]. Inwieweit diese Unterschiede in der 20-HETE Bildung zu den bekannten Geschlechtsunterschieden in der Anfälligkeit für Bluthochdruck-erkrankungen [110] beitragen, könnte ein interessanter Gegenstand für zukünftige Forschungen sein.

#### **4.2 CYP Eicosanoide – ein neues klinisches Target zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen?**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen weitere Ergebnisse erzielt, die zum Verständnis der pathophysiologischen Rolle des CYP-abhängigen Eicosanoid-Stoffwechsels beitragen:

1. 20-HETE trägt zur Entstehung des Nierenschadens bei Ischämie/Reperfusion bei (Abschnitt 4.2.1).
2. Der sEH-vermittelte Abbau von EETs ist mit der Entstehung der Herzinsuffizienz assoziiert (Abschnitt 4.2.2).
3.  $\omega$ -3 PUFAs verändern das Profil der CYP-abhängigen Metabolite (Abschnitt 4.2.3).

Zusammen mit den publizierten Befunden anderer Autoren zeichnen sich damit eine Reihe aussichtreicher Wege zur gezielten Beeinflussung der CYP-Eicosanoid Bildung und Wirkung unter pathophysiologischen Bedingungen ab (Abbildung 4-3). Ziel einer therapeutischen Intervention ist die Wiederherstellung einer physiologischen 20-HETE/EET Balance. Dies kann zum einen durch Inhibition der CYP4A-abhängigen 20-HETE Bildung und zum anderen über eine Hemmung des EET-Abbaus erfolgen. Erste hochwirksame CYP4A-Inhibitoren, wie das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte HET0016, wurden von der Taisho Company (Japan) entwickelt [88, 111]. Pionierarbeit zu der Entwicklung von sEH Inhibitoren wurde von der Gruppe um Dr. B. Hammock (UC Davis, California, USA) geleistet [89, 112, 113]. Diese befinden sich zurzeit in der Phase 1 der klinischen Untersuchungen (Arête Therapeutics). Weitere Strategien sind der Einsatz von 20-HETE Antagonisten bzw. EET Agonisten, wie sie insbesondere im Labor von Dr. J. R. Falck (UT Southwestern, Dallas, USA) verfolgt werden [114, 115, 116]. Unsere eigenen Ergebnisse deuten zugleich darauf hin, dass eine positive Beeinflussung des CYP-Eicosanoidprofils durch eine  $\omega$ -3 PUFA reiche Ernährung erreicht werden kann [84, 117, 118].

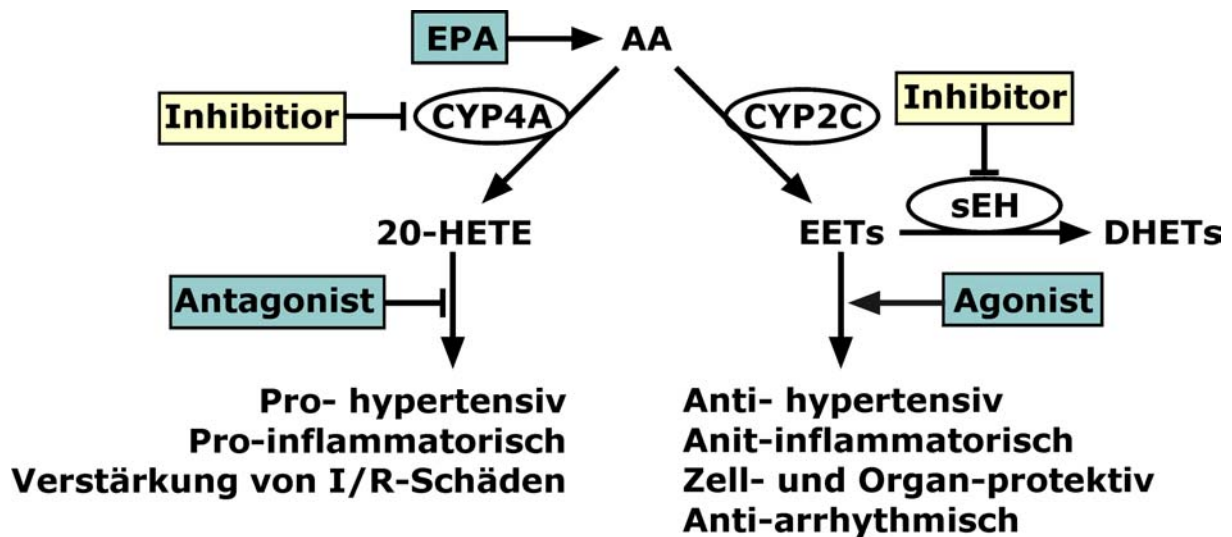


Abbildung 4-3: Möglichkeiten der gezielten Beeinflussung der CYP-Eicosanoid-Balance.

#### 4.2.1 Pharmakologische Beeinflussung der 20-HETE Bildung und Wirkung

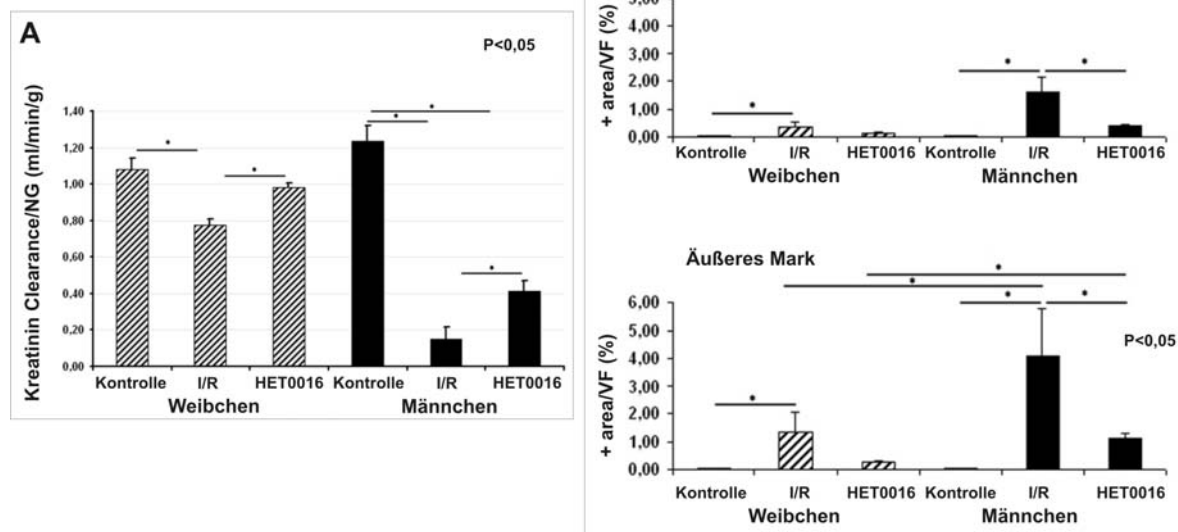
Renale I/R-Versuche werden häufig im Rattenmodell durchgeführt, um wichtige pathophysiologische Mechanismen des akuten Nierenversagens zu untersuchen. Unsere gemeinsamen Untersuchungen mit der Arbeitsgruppe von Dr. Duska Dragun (Charité) gingen von der Hypothese aus, dass die Bildung von 20-HETE zur Entstehung des I/R-Schaden beiträgt.

Uninephrektomie allein hatte einen unterschiedlichen Einfluss auf die 20-HETE Bildung in männlichen und weiblichen Ratten. In weiblichen Tieren führte der Verlust einer Niere zu einer signifikant erhöhten mikrosomalen 20-HETE und EET Bildung in der verbleibenden Niere. Im tubulären System der Niere verstärkt 20-HETE die Salzausscheidung. So ist es möglich, dass eine Uninephrektomie die Hochregulierung der 20-HETE und EET Bildung als eine Kompensationsreaktion auf verminderte Salzausscheidung auslöst. Ähnlich kompensieren Ratten eine hohe Salzbeladung (8 % Kochsalz im Futter) durch vermehrte 20-HETE und EET Bildung [119]. Warum dieser Mechanismus bei der Uninephrektomie männlicher Ratten nur schwach oder gar nicht einsetzt, ist unklar, könnte aber auf der von vorneherein höheren Kapazität der männlichen Niere beruhen.

Als Voraussetzung des Einsatzes von HET0016 im Tiermodell wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve zur Hemmung der renalen mikrosomalen Bildung von 20-HETE durch HET0016 erstellt (vgl. Abbildung 3-33 in 3.5.3). Die 20-HETE Bildung wurde in

beiden Geschlechtern der verwendeten Lewisratten in gleichem Umfang gehemmt. Eine nahezu vollständige Unterdrückung der 20-HETE Bildung wurde bereits durch 50 nM HET0016 erreicht, bei einer physiologischen AA Konzentration von 10  $\mu$ M. Dies steht in Übereinstimmung mit publizierten Daten, die einen IC<sub>50</sub> von 35 nM für die Hemmung der 20-HETE Bildung in der Rattenniere angeben [88]. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass HET0016 die 20-HETE Bildung in der Rattenniere mit hoher Spezifität hemmt. Bei vollständiger 20-HETE Hemmung blieb die Bildung von EETs und 19-HETE unbeeinflusst. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass HET0016 die 20-HETE Bildung durch humane Nierenmikrosomen mit ähnlich hoher Selektivität hemmt. Im Gegensatz dazu zeigen die eigenen Ergebnisse, dass HET0016 für das Mausmodell ungeeignet ist. Hier wurde die 20-HETE Bildung durch Nieren- und Lebermikrosomen, sowie aber auch durch Cyp4a12a erst bei deutlich höheren HET0016 Konzentrationen (größer als 1000 nM) gehemmt. Zudem war die Hemmung nicht selektiv auf die 20-HETE Bildung beschränkt, sondern betraf in gleichem Umfang die EET Bildung.

Dr. Uwe Hoff, Dr. Ivo Lukitsch und Prof. Dr. Duska Dragun untersuchten die pathophysiologischen Veränderungen der Niere durch I/R. I/R reduziert die Nierenfunktion gemessen an der Kreatinin-Clearance. Die Kreatinin-Clearance männlicher Lewisratten sank um 83 %, die weiblicher Tiere jedoch nur um 30 % (Abbildung 4-4A). Weiterhin war eine Nierenschädigung unter anderem anhand der Apoptoserate zu erkennen. Diese Schädigung war im äußeren Mark deutlich höher als im Kortex und bei männlichen Tieren stärker ausgeprägt als bei weiblichen (Abbildung 4-4B).



**Abbildung 4-4: Wirkung von HET0016 auf (A) die Nierenschädigung durch I/R und (B) die Apoptoserate [noch nicht veröffentlichte Daten, Hoff et al.].**

(A) Die Kreatinin-Clearance zeigte Geschlechtsunterschiede bei der Nierenschädigung durch I/R und nephroprotektive Wirkung von HET0016.

(B) TUNEL Färbungen von Kortex und äußerem Mark zeigten Geschlechtsunterschiede bei der Apoptoserate durch I/R und die anti-apoptotische Wirkung von HET0016.

Eine Behandlung der Tiere mit HET0016 vor I/R führte zu einer signifikanten Verbesserung der Nierenfunktion und senkte die Apoptoserate (Abbildung 4-4). Zur Erklärung dieser positiven Wirkungen von HET0016 auf den I/R Schaden wurden von uns bisher keine mechanistischen Untersuchungen durchgeführt. Wir gehen davon aus, dass HET0016 die de novo Synthese von 20-HETE unterdrückt. Übereinstimmend damit zeigten Untersuchungen an der isolierten perfundierten Niere (Dr. Ivo Lukitsch), dass die 20-HETE-Freisetzung bei I/R durch HET0016 signifikant gesenkt wird. Wie in Abbildung 4-5 gezeigt kann 20-HETE die Nierenfunktion in vielfältiger Weise beeinflussen. Seine Fähigkeit, als Mediator vasokonstriktiver Hormone zu fungieren, könnte unter I/R Bedingungen zu einer lang anhaltenden Gefäßverengung und damit Mangelversorgung des Nierengewebes führen. Weiterhin ist bekannt, dass 20-HETE eine Entkopplung der endothelialen NO Synthese induzieren kann [120]. Dies führt zu einer Schwächung vasodilatatorischer Mechanismen und darüber hinaus zur verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Zusammengefasst könnten diese vasokonstriktiven und pro-

inflammatorischen Wirkungen von 20-HETE eine Erklärung für die protektiven Effekte von HET0016 bei I/R liefern.

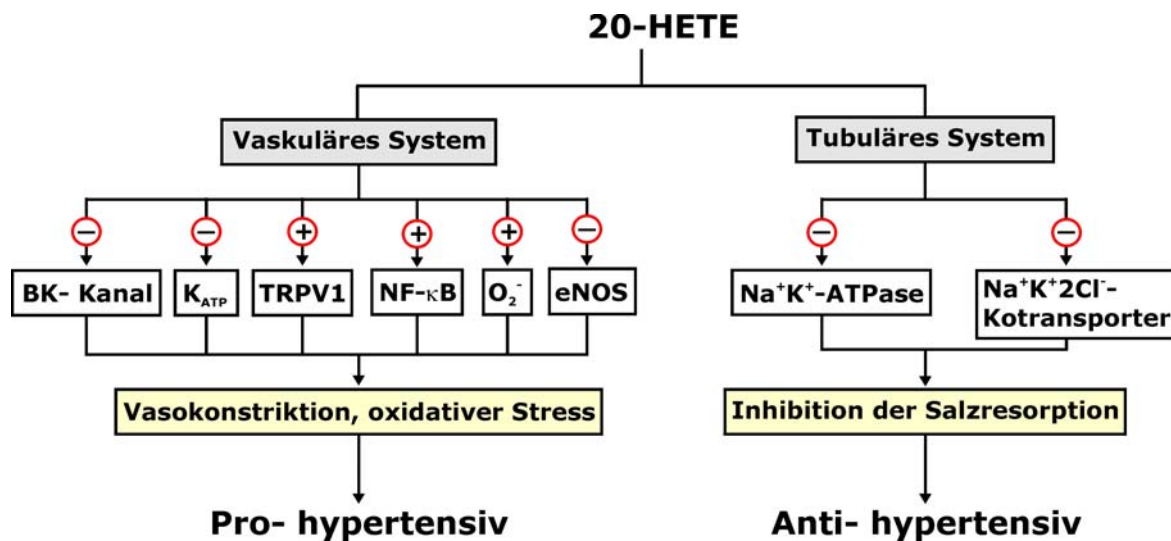


Abbildung 4-5: Pro- und anti-hypertensive Wirkung von 20-HETE in der Niere.

In eine ähnliche Richtung deuten auch Untersuchungen zur Ursache des Androgen- und Cyclosporin A-induzierten Bluthochdrucks in Rattenmodellen [121, 122]. Auch in diesen Modellen wird offensichtlich durch verstärkte 20-HETE Bildung eine endotheliale Dysfunktion in den Nierenarterien ausgelöst, die durch HET0016-vermittelte Inhibition der CYP4A-Enzyme korrigiert werden kann.

Warum bei gleicher 20-HETE Bildung und HET0016 Hemmung *in vitro* ein Geschlechtsunterschied *in vivo* beim Ausmaß des I/R Schadens auftritt, ist unklar. Neben vielen anderen Faktoren könnten CYP-NO-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen. Wie in der Einleitung beschrieben werden CYP-Enzyme generell durch NO gehemmt, d.h. bei ausreichender NO Bildung wird die 20-HETE Bildung in den Nierengefäßen unterdrückt [33, 34, 35, 36, 37]. Umgekehrt kommt es beim Ausfall der NO Bildung (endotheliale Dysfunktion) zu einer Demaskierung der 20-HETE Bildung. Somit könnte eine unterschiedlich hohe Expression der NOS in männlichen und weiblichen Tieren eine mögliche Erklärung für die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei I/R induziertem Nierenschaden sein [105, 123].

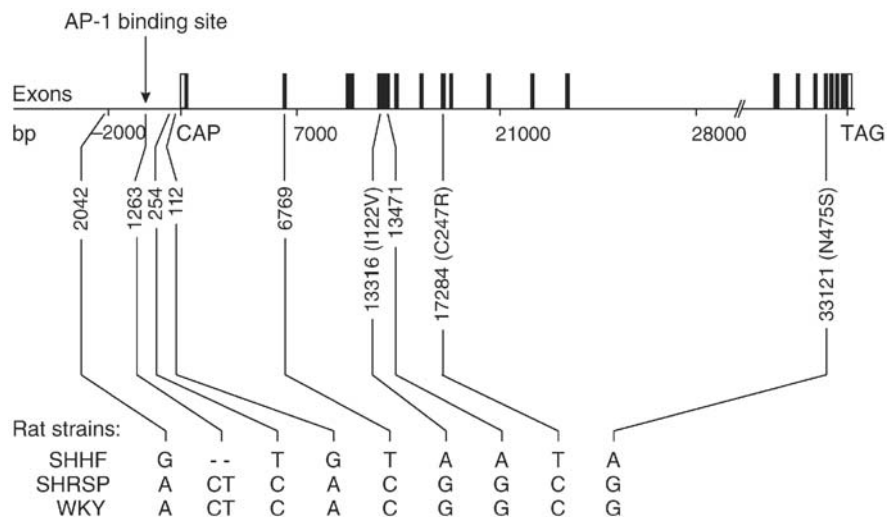
Zusammengenommen deuten diese Befunde darauf hin, dass mit einer Hemmung der 20-HETE Produktion zahlreiche positive Wirkungen wie eine Unterdrückung von Bluthochdruck, Nierenschädigungen und oxidativem Stress erreicht werden können.

Eine systemische Anwendung von HET0016 kann jedoch auch negative Effekte haben. So scheint ein 20-HETE-Mangel im tubulären System der Niere einen wichtigen Anteil an der Entwicklung von Salz-sensitivem Bluthochdruck zu haben. Hoagland et al. [119] zeigten, dass normale SD Ratten durch einfache Infusion von HET0016 einen Salz-sensitiven Phänotyp entwickeln.

#### 4.2.2 Erhöhung des kardio-vaskulären EET-Spiegels durch sEH Hemmung

SHHF (spontaneously hypertensive heart failure) Ratten sind ein häufig verwendetes Tiermodell für die Erforschung von grundlegenden Mechanismen der Entwicklung des Herzversagens als einer Spätfolge von Bluthochdruck und linksventrikulärer Herzhypertrophie. Genetische Analysen der Arbeitsgruppe Dr. Norbert Hübner (MDC) identifizierten den Locus für das sEH-Gen (*EPHX2*) als einen wichtigen Kandidaten für die Entstehung der Herzinsuffizienz in diesem Modell. Grundlage waren Kreuzungen mit genetisch verwandten Rattenstämmen (WKY und SHRSP). Ausgehend von diesen Befunden wurden dann gemeinsame Untersuchungen zur Expression der sEH in den Herzen von SHHF, SHRSP, WKY, sowie in den entsprechenden F2-Generationen durchgeführt.

Die Ergebnisse belegten das Vorliegen von signifikanten Unterschieden in der zytosolischen 14,15-EET Hydrolaseaktivität der Nieren und Herzen der einzelnen Stämme (Ergebnisse Abschnitt 3.7.4). Bei den SHHF Tieren war die Aktivität in der Niere mehr als 30-fach und die im Herzen 3-fach höher als in WKY und SHRSP. Darüber hinaus korrelierten die sEH Aktivitäten in der F2-Generation mit den allelen Varianten des *EPHX2* (siehe unten). Die Kollegen der Arbeitsgruppe Hübner konnten dann zeigen, dass diese Expressionsunterschiede auf Veränderungen im Promoterbereich des *EPHX2* zurück zu führen sind: Bei SHHF liegt eine intakte Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 vor, der durch Mutation in WKY und SHRSP zerstört wurde (Abbildung 4-6).



**Abbildung 4-6: Polymorphismen in der Promoter- und kodierenden Region von *Ephx2* [83].**

In der Promoterregion konnten vier SNPs identifiziert werden, einer davon eine Deletion zweier Nukleotide in der AP-1 Bindungsstelle in den Stämmen SHRSP und WKY. In den Exons (als schwarze Balken dargestellt) von *Ephx2* konnten fünf SNPs identifiziert werden, von denen drei zu Aminosäureaustauschen führten (Aminosäureaustausch in Klammern).

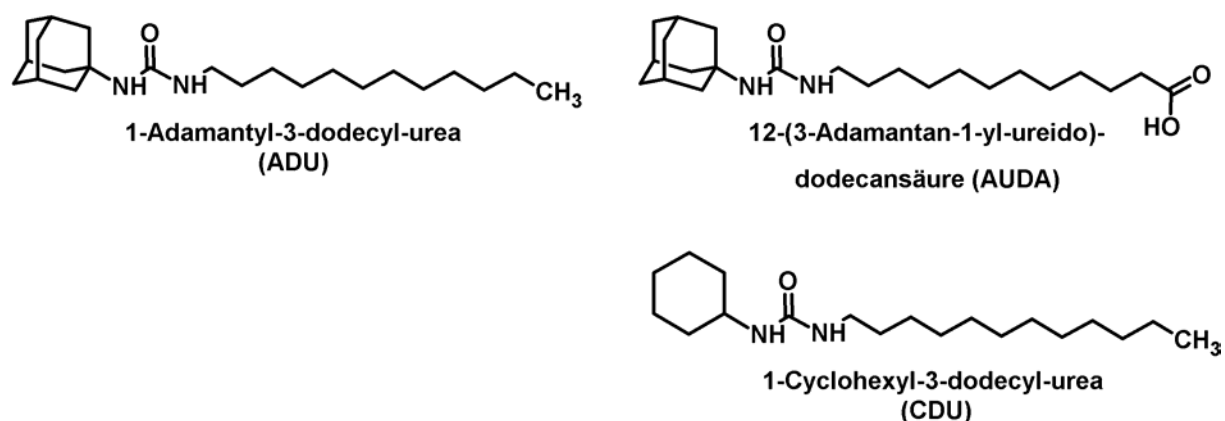
Auch in der Promoterregion des humanen *EPHX2* gibt es eine vergleichbare AP-1 Bindungsstelle, die bei erhöhtem ANG II Spiegel zu einer verstärkten Expression der sEH führt [68]. Die bisher beim Menschen bekannten Polymorphismen im *EPHX2* betreffen jedoch andere Positionen und führen z.T. auch zu Aminosäureaustauschen. Genetische Studien haben gezeigt, dass unterschiedliche Polymorphismen im *EPHX2* Gen mit dem Auftreten verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen und Schlaganfall assoziiert sind [124, 125, 126, 127].

Neben der Expressionshöhe und spezifischen Aktivität spielt möglicherweise auch die intrazelluläre Lokalisierung der sEH eine wichtige Rolle. Bekannt ist, dass dieses Enzym sowohl im Zytosol als auch in den Peroxisomen lokalisiert sein kann [67]. Wir konnten erstmalig zeigen, dass die sEH in den Herzen gesunder Mäuse in den Peroxisomen vorliegt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (vgl. Abschnitt 1.7) besteht die sEH aus einer Hydrolase- und einer Phosphatasedomäne. Die Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung von Farnesylpyrophosphat und verwandten Verbindungen, deren Biosynthese vorwiegend in den Peroxisomen erfolgt. Von den EETs, den Substraten der Hydrolasedomäne, nimmt man dagegen an, dass sie im Zytosol vorliegen. Demzufolge könnte ein Wechsel der intrazellulären Lokalisierung auch einen Wechsel der enzymatischen Funktion zur Folge haben.



Inwieweit dies jedoch von physiologischer Bedeutung ist und wodurch eine Veränderung der Lokalisierung verursacht wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Entwicklung von Pharmaka zur Hemmung der Hydrolasedomäne der sEH ist bereits weit fortgeschritten. Die Arbeitsgruppe von Bruce Hammock hat dazu Substanzen entwickelt, deren allgemeine Struktur N,N-substituierte Harnstoffderivate sind (Abbildung 4-7) [89, 112, 113].



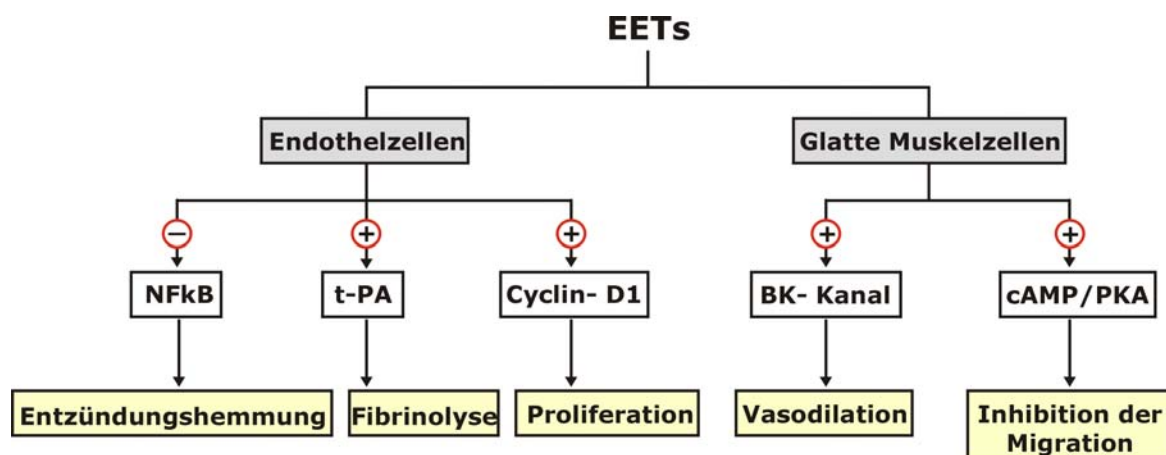
**Abbildung 4-7: Strukturformeln der sEH Inhibitoren ADU, AUDA und CDU.**

Bei den eigenen Untersuchungen wurde ADU eingesetzt. Diese Substanz hemmte die 14,15-EET Hydrolaseaktivität in der zytosolischen Fraktion von Mausnieren mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von ca. 10 nM. ADU blockierte auch die 14,15-EET Hydrolyse in intakten Mesenterialarterien der Maus, allerdings waren dazu deutliche höhere Konzentrationen notwendig (siehe Abbildung 3.7.2), was wahrscheinlich auf eine schlechte Aufnahme von ADU durch die Gefäße zurückzuführen ist. Bei hohen Konzentrationen (10 µM) sank die Hydrolaseaktivität nahezu auf das Niveau von Gefäßen, die aus sEH knockout Mäusen isoliert wurden. Da die verbliebene Restaktivität in der Größenordnung der Spontanhydrolyse lag, ist anzunehmen, dass die EET Hydrolyse ausschließlich durch die sEH katalysiert wird. Inwieweit dies allerdings auf alle Organe und Gewebe der Maus zutrifft, ist noch unklar. Neuere Befunde der Arbeitsgruppe um Arand [128] deuten auf das Vorliegen weiterer EET-Hydrolasen im Gehirn hin.

In jüngster Zeit gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die über positive therapeutische Effekte der sEH Inhibitoren in verschiedenen Tiermodellen berichten: Senkung des Blutdrucks in SHR, DOCA-Salz hypertensiven Ratten und ANG II

hypertensiven Mäusen [71, 129, 130], Verhinderung der TAC (thoracic aortic constriction)–induzierten Herzhypertrophie in Mäusen [72] und Senkung des Schlaganfallrisikos in SHRSP [131].

Zur Erklärung dieser positiven Effekte der sEH Inhibitoren wird allgemein angenommen, dass ihre Gabe zu einer Erhöhung der EET-Spiegel in den Gefäßen, im Herzen, in der Niere und in anderen Organen führt. Wie bereits in der Einleitung erläutert und zusammenfassend in Abbildung 4-8 dargestellt, haben EETs gefäßerweiternde, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften, die gemeinsam zu einer Protektion vor Endorganschäden und Hypertonie beitragen können.



**Abbildung 4-8: Positive Wirkungen von EETs in der Vaskulatur.**

Darüber hinaus könnte die Expression der sEH ebenso wie die von CYP4A/20-HETE (vgl. Abschnitt 4.1) zu den geschlechtsspezifischen Faktoren gehören, die die Anfälligkeit für Herz-Kreislauf-Erkrankungen modulieren. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die sEH Aktivität in der Niere von männlichen Mäusen 2- bis 3-fach höher ist als in weiblichen (Abbildung 3.7.1). Ähnliches wurde zuvor bereits für die Mausleber berichtet [132]. Weitere Arbeiten belegen, dass Androgene die sEH Expression induzieren [133], während Östrogene repressiv wirken [134].

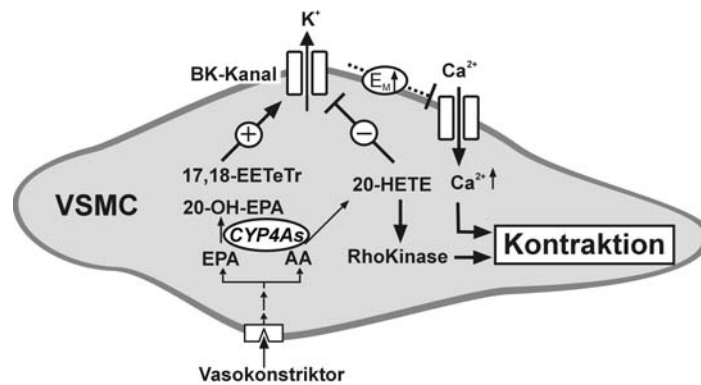
#### 4.2.3 Beeinflussung der Eicosanoid-Balance durch $\omega$ -3 PUFAs

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Substrat- und Wirkungsspezifität der Cyp4a-Enzyme führten zu dem überraschenden Befund, dass

diese bei der Umsetzung von AA ausschließlich als Hydroxylasen fungieren, bei Vorliegen einer  $\omega$ -3 Doppelbindung im Substrat wie bei EPA aber auch als Epoxygenasen wirken. Es werden also sowohl von Cyp4a12a, als auch von Cyp4a12b aus AA und EPA ganz unterschiedlich zusammengesetzte Metabolitprofile gebildet. In letzter Zeit mehren sich die Befunde, dass ebenso wie Cyp4a12 wahrscheinlich alle CYP-Isoformen, die AA metabolisieren auch EPA und DHA als effektive Substrate akzeptieren. So wurde im Labor von Dr. W.-H. Schunck und von anderen Autoren gezeigt, dass auch verschiedene andere AA metabolisierende CYP-Isoformen, wie die CYP2C-Isoformen der Ratte und die humanen CYP2C-Isoformen, sowie CYP2J2 und CYP1A1,  $\omega$ -3 PUFAs als effiziente alternative Substrate akzeptieren [84, 117, 135, 136]. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass das unter *in vivo* Bedingungen vorliegende CYP-Eicosanoid Profil in hohem Maße durch die Fettsäurezusammensetzung der Ernährung bestimmt wird. Dies könnte nicht nur wie oben beschrieben für die Gefäßregulation sondern ebenso auch für die Herz- und Nierenfunktionen von Bedeutung sein. Wir konnten kürzlich in einem Rattenmodell zeigen, dass bei Ernährung mit einer  $\omega$ -3 PUFA reichen Diät der 20-HETE Spiegel sinkt und im Gegenzug die Bildung von 20-HEPE und 17,18-EETeTr steigt (unveröffentlichte eigene Ergebnisse).

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sind  $\omega$ -3 Epoxide, wie 17,18-EETeTr und 19,20-EDP, effektive Substrate für die sEH. Ihre Umsatzgeschwindigkeiten für 17,18-EETeTr und 19,20-EDP liegen zwischen 3 und 6 nmol/ $\mu$ g/min und damit in einer ähnlichen Größenordnung wie für 11,12-EET (Abschnitt 3.7.5.2). Besonders bemerkenswert war der Befund, dass die Hydrolyse von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP mit hoher Stereoselektivität abläuft. Bei beiden Substraten wurde das R,S-Enantiomer mit höherer katalytischer Effektivität hydrolysiert als das S,R-Enantiomer.

Die physiologische Funktion der CYP-abhängigen  $\omega$ -3 Epoxide ist bisher wenig untersucht. Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Dr. W.-H. Schunck und Dr. M. Gollasch zeigten, dass 17,18-EETeTr ein starker Aktivator des BK Kanals ist und vasodilatatorisch wirkt [137, 138]. Die Wirkung von 17,18-EETeTr auf den BK-Kanal ist antagonistisch zu der von 20-HETE (Abbildung 4-9). Über die biologische Aktivität von 20-HEPE ist bisher nichts bekannt.

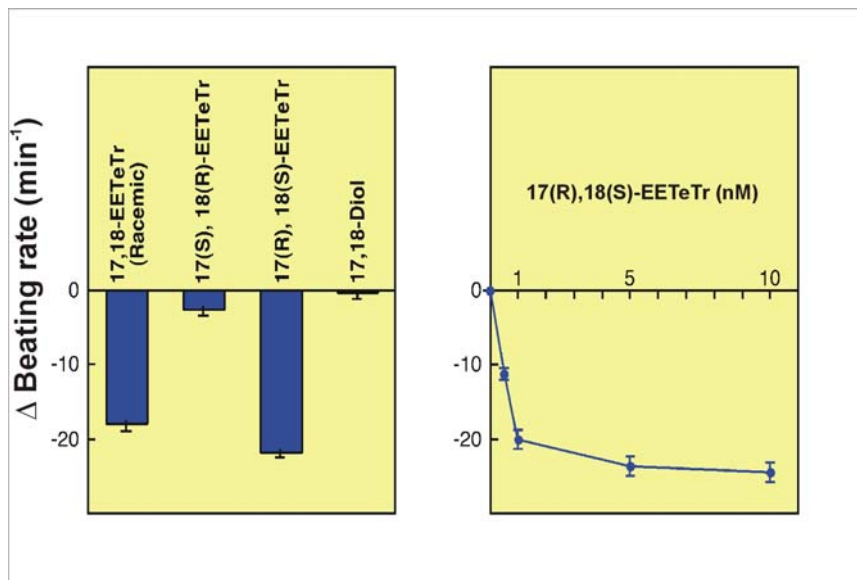


**Abbildung 4-9: Wirkung von 20-HETE und 17,18-EETeTr auf glatte Muskelzellen (VSMC).**

Die BK-Kanal Aktivierung durch 17,18-EETeTr ist hoch stereoselektiv, d.h. nur das R,S Enantiomer, aber nicht das S,R-Enantiomer, ist wirksam [138]. Die Untersuchungen zur BK-Kanal-Aktivierung zeigten darüber hinaus, dass das 17,18-Diol nicht wirksam ist.

In Zusammenarbeit mit Dr. G. Wallukat konnte an spontan schlagenden neonatalen Rattenkardiomyozyten ein negativ chronotroper Effekt von 17,18-EETeTr nachgewiesen werden. Auch hier ist nur das R,S-Enantiomer wirksam. Das S,R-Enantiomer, sowie das 17,18-Diol waren nicht wirksam (vgl. Abbildung 4-10).

Im Zusammenhang mit diesen beiden Beispielen der stereoselektiven Wirkung von 17,18-EETeTr ist es von Interesse, dass auch die Bildung und der Abbau dieses Metaboliten stereoselektiv erfolgen. So zeigte Cyp4a12a bei der Epoxidationsreaktion eine hohe Stereoselektivität und bildete zu 73 % 17(R),18(S)-EETeTr. Auch verschiedene CYP2C-Isoformen katalysieren vorzugsweise die Epoxidation von EPA zum biologisch aktiven 17(R),18(S)-EETeTr [117, 136]. Auf der anderen Seite hydrolysiert die sEH mit hoher katalytischer Effektivität 17(R),18(S)-EETeTr und hinterlässt das inaktive S,R-Enantiomer.



**Abbildung 4-10: Negativ chronotroper Effekt von 17(R),18(S)-EETeTr auf die Schlagrate spontan schlagender neonataler Rattenkardiomyozyten.**

Zusammengenommen zeichnet sich ab, dass die positiven Wirkungen von  $\omega$ -3 PUFAs auf Gefäß- und Herzfunktionen z.T. auf Veränderungen des CYP-abhängigen Eicosanoid-Stoffwechsels und die Bildung von 17(R),18(S)-EETeTr und ähnlichen Metaboliten zurückzuführen sein könnte.

## 5 Ausblick: Transgene Mausmodelle zur Analyse der pathophysiologischen Rolle von 20-HETE

In der vorliegenden Arbeit konnte Cyp4a12a als die 20-HETE Synthase der Mausniere identifiziert und ihre enzymatischen Eigenschaften charakterisiert werden. Darüber hinaus konnte die Induktion der renalen 20-HETE Bildung und Expression von Cyp4a12a auf mRNA- und Proteinebene durch Androgene nachgewiesen werden. In einem weiteren Schritt gelang es, eine transgene Maus für Überexpressionen von Cyp4a12a herzustellen. Die Gewebespezifität bei der Überexpression wird durch Kreuzung mit entsprechenden Cre Mäusen erreicht.

Für eine spezifische Expression in glatten Muskelzellen der Vaskulatur wurde in der vorliegenden Arbeit eine Expression der Cre-Rekombinase unter dem SM22 $\alpha$  Promoter gewählt. Dies resultierte allerdings in einer Überexpression von Cyp4a12a in den Gefäßen und im Herzen. Zurückzuführen ist die Expression im Herzen auf eine Expression von SM22 $\alpha$  in premyocardialem Gewebe während der embryonalen Entwicklung der Maus ((E) 8.0 – 13.5). Um die Effekte einer verstärkten 20-HETE Bildung zu untersuchen ist es jedoch notwendig, eine lokale Überexpression von Cyp4a12a in einzelnen Organen oder Geweben zu erzielen. Dies soll künftig mit einem induzierbaren SM22 $\alpha$  Promoter verwirklicht werden.

Insgesamt sollen in absehbarer Zeit drei Mausmodelle mit einer spezifischen lokalen Überexpression von Cyp4a12a untersucht werden (Abbildung 5-1).

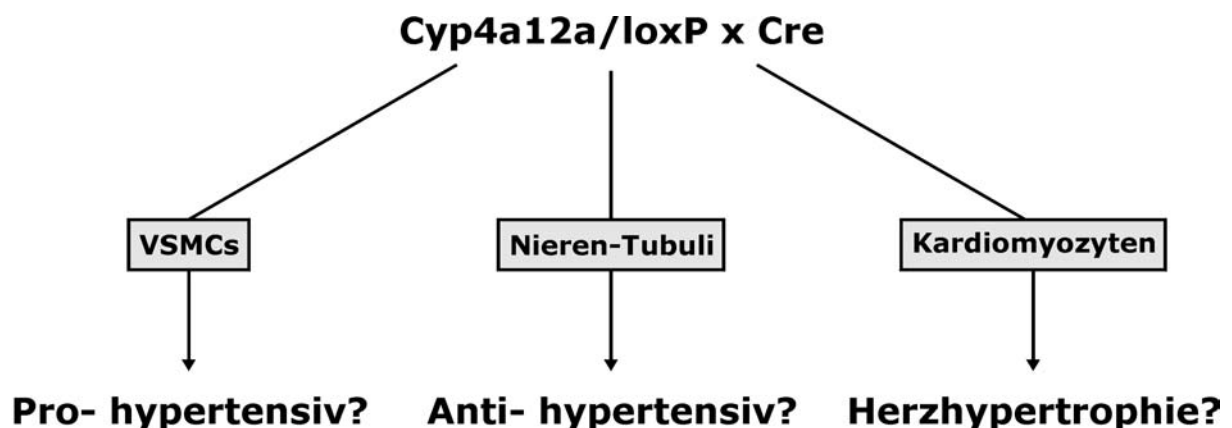


Abbildung 5-1: Mausmodelle zur Überexpression von Cyp4a12a in VSMC, Nierentubuli und Kardiomyozyten.

1. Eine spezifische Expression von Cyp4a12a in VSMC soll durch die Kreuzung der Cyp4a12a/loxP-Maus mit einer transgenen Maus mit der Cre-Rekombinase unter einem induzierbaren Sm22 $\alpha$  Promoter erreicht werden. Ziel der Untersuchungen wird es sein, zu klären, ob eine Überexpression von 20-HETE in der Vaskulatur zu endothelialer Dysfunktion und einer verstärkten Ansprechbarkeit auf prohypertensive Stimuli (z.B. Ang II) führt und welche Rolle eine verstärkte Bildung von 20-HETE in Nierengefäßen bei I/R-Schäden spielt.
2. Eine spezifische Expression von Cyp4a12a in den proximalen Tubuli der Nieren soll durch die Kreuzung der Cyp4a12a/loxP-Maus mit einer transgenen Maus mit der Cre-Rekombinase unter dem Apo-E Promoter erreicht werden. Mit Hilfe dieses Mausmodells soll die Rolle von 20-HETE bei der Salzausscheidung unter Basalbedingungen und unter hoher Salzbelastung untersucht werden.
3. Eine spezifische Expression von Cyp4a12a in Kardiomyozyten soll durch die Kreuzung der Cyp4a12a/loxP-Maus mit einer MHC-Cre-Maus erreicht werden. Hier soll analysiert werden, ob eine gesteigerte Bildung von 20-HETE zu Herzhypertrophie führt und die Schäden durch I/R verstärkt.

Weiterhin kann an diesen Modellen auch die ernährungsspezifische Modulation des CYP-Eicosanoid-Stoffwechsels durch Fütterung mit  $\omega$ -3 PUFAs untersucht werden. So ist zu erwarten, dass die negativen Effekte einer Cyp4a12a-Überexpression und damit verstärkten Bildung von 20-HETE in der Vaskulatur und im Herzen durch EPA Fütterung abgemildert wird, da Cyp4a12a diese Fettsäure zu einem großen Teil in 17,18-EETeTr umwandelt, das positive Effekte auf die kardiovaskulären Funktionen zu haben scheint.

Insgesamt bieten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gute Voraussetzungen für die Entwicklung von Tiermodellen mit gewebespezifischer Überexpression von Cyp4a12a, die es ermöglichen, die Rolle von 20-HETE *in vivo* zu untersuchen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Funk, C. D. (2001): Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294 [5548], Seite 1871-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11729303](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11729303)
- [2] Capdevila, J.; Chacos, N.; Werringloer, J.; Prough, R. A. und Estabrook, R. W. (1981): Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 [9], Seite 5362-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6795631](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6795631)
- [3] Capdevila, J.; Parkhill, L.; Chacos, N.; Okita, R.; Masters, B. S. und Estabrook, R. W. (1981): The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450, *Biochem Biophys Res Commun* 101 [4], Seite 1357-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6796083](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6796083)
- [4] Morrison, A. R. und Pascoe, N. (1981): Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 [12], Seite 7375-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6801649](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6801649)
- [5] Oliw, E. H. und Oates, J. A. (1981): Oxygenation of arachidonic acid by hepatic microsomes of the rabbit. Mechanism of biosynthesis of two vicinal dihydroxyeicosatrienoic acids, *Biochim Biophys Acta* 666 [3], Seite 327-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6798994](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6798994)
- [6] Omura, T. und Sato, R. (1964): The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties, *J Biol Chem* 239, Seite 2379-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14209972](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14209972)
- [7] Capdevila, J. H. und Falck, J. R. (2002): Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, Seite 325-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12432927](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432927)
- [8] Capdevila, J. H.; Falck, J. R. und Estabrook, R. W. (1992): Cytochrome P450 and the arachidonate cascade, *Faseb J* 6 [2], Seite 731-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1537463](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1537463)
- [9] Nelson, D. R.; Zeldin, D. C.; Hoffman, S. M.; Maltais, L. J.; Wain, H. M. und Nebert, D. W. (2004): Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants, *Pharmacogenetics* 14 [1], Seite 1-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15128046](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15128046)
- [10] Gainer, J. V.; Bellamine, A.; Dawson, E. P.; Womble, K. E.; Grant, S. W.; Wang, Y.; Cupples, L. A.; Guo, C. Y.; Demissie, S.; O'Donnell, C. J.; Brown, N. J.; Waterman, M. R. und Capdevila, J. H. (2005): Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension, *Circulation* 111 [1], Seite 63-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15611369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15611369)
- [11] Powell, P. K.; Wolf, I.; Jin, R. und Lasker, J. M. (1998): Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11, *J Pharmacol Exp Ther* 285 [3], Seite 1327-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9618440](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9618440)
- [12] Helvig, C.; Dishman, E. und Capdevila, J. H. (1998): Molecular, enzymatic, and regulatory characterization of rat kidney cytochromes P450 4A2 and 4A3, *Biochemistry* 37 [36], Seite 12546-58. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9730827](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9730827)
- [13] Hoch, U.; Zhang, Z.; Kroetz, D. L. und Ortiz de Montellano, P. R. (2000): Structural determination of the substrate specificities and regioselectivities of the rat and human fatty acid omega-hydroxylases, *Arch Biochem Biophys* 373 [1], Seite 63-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10620324](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10620324)
  - [14] Nguyen, X.; Wang, M. H.; Reddy, K. M.; Falck, J. R. und Schwartzman, M. L. (1999): Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors, *Am J Physiol* 276 [6 Pt 2], Seite R1691-700. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10362749](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10362749)
  - [15] Wang, M. H.; Stec, D. E.; Balazy, M.; Mastuygin, V.; Yang, C. S.; Roman, R. J. und Schwartzman, M. L. (1996): Cloning, sequencing, and cDNA-directed expression of the rat renal CYP4A2: arachidonic acid omega-hydroxylation and 11,12-epoxidation by CYP4A2 protein, *Arch Biochem Biophys* 336 [2], Seite 240-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8954571](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8954571)
  - [16] Ito, O.; Alonso-Galicia, M.; Hopp, K. A. und Roman, R. J. (1998): Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron, *Am J Physiol* 274 [2 Pt 2], Seite F395-404. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9486235](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9486235)
  - [17] Nakagawa, K.; Marji, J. S.; Schwartzman, M. L.; Waterman, M. R. und Capdevila, J. H. (2003): Androgen-mediated induction of the kidney arachidonate hydroxylases is associated with the development of hypertension, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 [4], Seite R1055-62. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12531784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12531784)
  - [18] Schwartzman, M. L.; da Silva, J. L.; Lin, F.; Nishimura, M. und Abraham, N. G. (1996): Cytochrome P450 4A expression and arachidonic acid omega-hydroxylation in the kidney of the spontaneously hypertensive rat, *Nephron* 73 [4], Seite 652-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8856265](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8856265)
  - [19] Roman, R. J. (2002): P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function, *Physiol Rev* 82 [1], Seite 131-85. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11773611](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11773611)
  - [20] Holla, V. R.; Adas, F.; Imig, J. D.; Zhao, X.; Price, E., Jr.; Olsen, N.; Kovacs, W. J.; Magnuson, M. A.; Keeney, D. S.; Breyer, M. D.; Falck, J. R.; Waterman, M. R. und Capdevila, J. H. (2001): Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [9], Seite 5211-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11320253](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11320253)
  - [21] Stec, D. E.; Flasch, A.; Roman, R. J. und White, J. A. (2003): Distribution of cytochrome P-450 4A and 4F isoforms along the nephron in mice, *Am J Physiol Renal Physiol* 284 [1], Seite F95-102. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12388424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12388424)
  - [22] Nakagawa, K.; Holla, V. R.; Wei, Y.; Wang, W. H.; Gatica, A.; Wei, S.; Mei, S.; Miller, C. M.; Cha, D. R.; Price, E., Jr.; Zent, R.; Pozzi, A.; Breyer, M. D.; Guan, Y.; Falck, J. R.; Waterman, M. R. und Capdevila, J. H. (2006): Salt-sensitive hypertension is associated with dysfunctional Cyp4a10 gene and kidney epithelial sodium channel, *J Clin Invest* 116 [6], Seite 1696-702. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16691295](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16691295)
  - [23] Campbell, W. B. und Falck, J. R. (2007): Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors, *Hypertension* 49 [3], Seite 590-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17200437](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17200437)
  - [24] Wei, Y.; Sun, P.; Wang, Z.; Yang, B.; Carroll, M. A. und Wang, W. H. (2006): Adenosine inhibits ENaC via cytochrome P-450 epoxygenase-dependent metabolites of arachidonic acid, *Am J Physiol Renal*

- Physiol 290 [5], Seite F1163-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16234312](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16234312)
- [25] Sun, P.; Lin, D. H.; Wang, T.; Babilonia, E.; Wang, Z.; Jin, Y.; Kemp, R.; Nasjletti, A. und Wang, W. H. (2006): Low Na intake suppresses expression of CYP2C23 and arachidonic acid-induced inhibition of ENaC, *Am J Physiol Renal Physiol* 291 [6], Seite F1192-200. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16849695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16849695)
  - [26] Spector, A. A.; Fang, X.; Snyder, G. D. und Weintraub, N. L. (2004): Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function, *Prog Lipid Res* 43 [1], Seite 55-90. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14636671](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14636671)
  - [27] Spector, A. A. und Norris, A. W. (2007): Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function, *Am J Physiol Cell Physiol* 292 [3], Seite C996-1012. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16987999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16987999)
  - [28] Huang, A.; Sun, D.; Wu, Z.; Yan, C.; Carroll, M. A.; Jiang, H.; Falck, J. R. und Kaley, G. (2004): Estrogen elicits cytochrome P450--mediated flow-induced dilation of arterioles in NO deficiency: role of PI3K-Akt phosphorylation in genomic regulation, *Circ Res* 94 [2], Seite 245-52. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14670845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14670845)
  - [29] Quilley, J.; Fulton, D. und McGiff, J. C. (1997): Hyperpolarizing factors, *Biochem Pharmacol* 54 [10], Seite 1059-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9464448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9464448)
  - [30] Bolad, I. und Delafontaine, P. (2005): Endothelial dysfunction: its role in hypertensive coronary disease, *Curr Opin Cardiol* 20 [4], Seite 270-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15956822](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15956822)
  - [31] Ward, N. C.; Rivera, J.; Hodgson, J.; Puddey, I. B.; Beilin, L. J.; Falck, J. R. und Croft, K. D. (2004): Urinary 20-hydroxyeicosatetraenoic acid is associated with endothelial dysfunction in humans, *Circulation* 110 [4], Seite 438-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15262846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15262846)
  - [32] Abraham, N. G. und Kappas, A. (2005): Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system, *Free Radic Biol Med* 39 [1], Seite 1-25. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15925276](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15925276)
  - [33] Fisslthaler, B.; Michaelis, U. R.; Randriamboavonjy, V.; Busse, R. und Fleming, I. (2003): Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone: novel role for HMG-CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP 2C expression, *Biochim Biophys Acta* 1619 [3], Seite 332-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12573493](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12573493)
  - [34] Kuncewicz, T.; Sheta, E. A.; Goldknopf, I. L. und Kone, B. C. (2003): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in mesangial cells, *Mol Cell Proteomics* 2 [3], Seite 156-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12671063](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12671063)
  - [35] Lin, H. L.; Kent, U. M.; Zhang, H.; Waskell, L. und Hollenberg, P. F. (2003): Mutation of tyrosine 190 to alanine eliminates the inactivation of cytochrome P450 2B1 by peroxynitrite, *Chem Res Toxicol* 16 [2], Seite 129-36. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12588183](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12588183)
  - [36] Oyekan, A. (2002): Nitric oxide inhibits renal cytochrome P450-dependent epoxygenases in the rat, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 [11], Seite 990-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12366390](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12366390)
  - [37] Wang, M. H.; Wang, J.; Chang, H. H.; Zand, B. A.; Jiang, M.; Nasjletti, A. und Laniado-Schwartzman, M. (2003): Regulation of renal CYP4A expression and 20-HETE synthesis by nitric oxide in pregnant

- rats, *Am J Physiol Renal Physiol* 285 [2], Seite F295-302. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12684227](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12684227)
- [38] Feletou, M. und Vanhoutte, P. M. (2006): Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 [6], Seite 1215-25. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16543495](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16543495)
- [39] Fleming, I. und Busse, R. (2006): Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function, *Hypertension* 47 [4], Seite 629-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16490839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16490839)
- [40] Kohler, R. und Hoyer, J. (2007): The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models, *Kidney Int* 72 [2], Seite 145-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17457372](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17457372)
- [41] Imig, J. D. (2000): Eicosanoid regulation of the renal vasculature, *Am J Physiol Renal Physiol* 279 [6], Seite F965-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11097615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11097615)
- [42] McGiff, J. C. und Quilley, J. (1999): 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings, *Am J Physiol* 277 [3 Pt 2], Seite R607-23. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10484476](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10484476)
- [43] Randriamboavonjy, V.; Busse, R. und Fleming, I. (2003): 20-HETE-induced contraction of small coronary arteries depends on the activation of Rho-kinase, *Hypertension* 41 [3 Pt 2], Seite 801-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12623999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12623999)
- [44] Lee, H. C.; Lu, T.; Weintraub, N. L.; VanRollins, M.; Spector, A. A. und Shibata, E. F. (1999): Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes, *J Physiol* 519 Pt 1, Seite 153-68. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10432346](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10432346)
- [45] Lu, T.; VanRollins, M. und Lee, H. C. (2002): Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study, *Mol Pharmacol* 62 [5], Seite 1076-83. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12391270](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12391270)
- [46] Xiao, Y. F. (2007): Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> and transient outward K<sup>+</sup> channel activities by epoxyeicosatrienoic acids, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82 [1-4], Seite 11-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17164128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17164128)
- [47] Xiao, Y. F.; Huang, L. und Morgan, J. P. (1998): Cytochrome P450: a novel system modulating Ca<sup>2+</sup> channels and contraction in mammalian heart cells, *J Physiol* 508 ( Pt 3), Seite 777-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9518732](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9518732)
- [48] Xiao, Y. F.; Ke, Q.; Seubert, J. M.; Bradbury, J. A.; Graves, J.; Degraff, L. M.; Falck, J. R.; Krausz, K.; Gelboin, H. V.; Morgan, J. P. und Zeldin, D. C. (2004): Enhancement of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of CYP2J2, *Mol Pharmacol* 66 [6], Seite 1607-16. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15361551](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15361551)
- [49] Gross, G. J.; Hsu, A.; Falck, J. R. und Nithipatikom, K. (2007): Mechanisms by which epoxyeicosatrienoic acids (EETs) elicit cardioprotection in rat hearts, *J Mol Cell Cardiol* 42 [3], Seite 687-91. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17217955](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17217955)

- [50] Seubert, J.; Yang, B.; Bradbury, J. A.; Graves, J.; Degraff, L. M.; Gabel, S.; Gooch, R.; Foley, J.; Newman, J.; Mao, L.; Rockman, H. A.; Hammock, B. D.; Murphy, E. und Zeldin, D. C. (2004): Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and p42/p44 MAPK pathway, *Circ Res* 95 [5], Seite 506-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15256482](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15256482)
- [51] Seubert, J. M.; Zeldin, D. C.; Nithipatikom, K. und Gross, G. J. (2007): Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82 [1-4], Seite 50-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17164132](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17164132)
- [52] Gross, E. R.; Nithipatikom, K.; Hsu, A. K.; Peart, J. N.; Falck, J. R.; Campbell, W. B. und Gross, G. J. (2004): Cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibition reduces infarct size during reperfusion via the sarcolemmal KATP channel, *J Mol Cell Cardiol* 37 [6], Seite 1245-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15572055](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15572055)
- [53] Nithipatikom, K.; Endsley, M. P.; Moore, J. M.; Isbell, M. A.; Falck, J. R.; Campbell, W. B. und Gross, G. J. (2006): Effects of selective inhibition of cytochrome P-450 omega-hydroxylases and ischemic preconditioning in myocardial protection, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 [2], Seite H500-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16214838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16214838)
- [54] Nithipatikom, K.; Gross, E. R.; Endsley, M. P.; Moore, J. M.; Isbell, M. A.; Falck, J. R.; Campbell, W. B. und Gross, G. J. (2004): Inhibition of cytochrome P450 omega-hydroxylase: a novel endogenous cardioprotective pathway, *Circ Res* 95 [8], Seite e65-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15388642](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15388642)
- [55] Widstrom, R. L.; Norris, A. W.; Van Der Veer, J. und Spector, A. A. (2003): Fatty acid-binding proteins inhibit hydration of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase, *Biochemistry* 42 [40], Seite 11762-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14529287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14529287)
- [56] Cowart, L. A.; Wei, S.; Hsu, M. H.; Johnson, E. F.; Krishna, M. U.; Falck, J. R. und Capdevila, J. H. (2002): The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands, *J Biol Chem* 277 [38], Seite 35105-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12124379](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12124379)
- [57] Muller, D. N.; Theuer, J.; Shagdarsuren, E.; Kaergel, E.; Honeck, H.; Park, J. K.; Markovic, M.; Barbosa-Sicard, E.; Dechend, R.; Wellner, M.; Kirsch, T.; Fiebeler, A.; Rothe, M.; Haller, H.; Luft, F. C. und Schunck, W. H. (2004): A peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator induces renal CYP2C23 activity and protects from angiotensin II-induced renal injury, *Am J Pathol* 164 [2], Seite 521-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14742258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14742258)
- [58] Ferreri, N. R.; McGiff, J. C.; Carroll, M. A. und Quilley, J. (2004): Renal COX-2, cytokines and 20-HETE: tubular and vascular mechanisms, *Curr Pharm Des* 10 [6], Seite 613-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14965324](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14965324)
- [59] Moreland, K. T.; Procknow, J. D.; Sprague, R. S.; Iverson, J. L.; Lonigro, A. J. und Stephenson, A. H. (2007): Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 participate in 5,6-epoxyeicosatrienoic acid-induced contraction of rabbit intralobar pulmonary arteries, *J Pharmacol Exp Ther* 321 [2], Seite 446-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17267581](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17267581)
- [60] Cronin, A.; Mowbray, S.; Durk, H.; Homburg, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Oesch, F. und Arand, M. (2003): The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [4], Seite 1552-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12574508](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12574508)
- [61] Newman, J. W.; Morisseau, C.; Harris, T. R. und Hammock, B. D. (2003): The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity,

- Proc Natl Acad Sci U S A 100 [4], Seite 1558-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12574510](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12574510)
- [62] Tran, K. L.; Aronov, P. A.; Tanaka, H.; Newman, J. W.; Hammock, B. D. und Morisseau, C. (2005): Lipid sulfates and sulfonates are allosteric competitive inhibitors of the N-terminal phosphatase activity of the mammalian soluble epoxide hydrolase, *Biochemistry* 44 [36], Seite 12179-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16142916](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16142916)
- [63] Enayetallah, A. E. und Grant, D. F. (2006): Effects of human soluble epoxide hydrolase polymorphisms on isoprenoid phosphate hydrolysis, *Biochem Biophys Res Commun* 341 [1], Seite 254-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16414022](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16414022)
- [64] Inceoglu, B.; Schmelzer, K. R.; Morisseau, C.; Jinks, S. L. und Hammock, B. D. (2007): Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs), *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82 [1-4], Seite 42-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17164131](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17164131)
- [65] Zeldin, D. C.; Kobayashi, J.; Falck, J. R.; Winder, B. S.; Hammock, B. D.; Snapper, J. R. und Capdevila, J. H. (1993): Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase, *J Biol Chem* 268 [9], Seite 6402-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8454612](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8454612)
- [66] Zeldin, D. C.; Wei, S.; Falck, J. R.; Hammock, B. D.; Snapper, J. R. und Capdevila, J. H. (1995): Metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by cytosolic epoxide hydrolase: substrate structural determinants of asymmetric catalysis, *Arch Biochem Biophys* 316 [1], Seite 443-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7840649](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7840649)
- [67] Enayetallah, A. E.; French, R. A.; Barber, M. und Grant, D. F. (2006): Cell-specific subcellular localization of soluble epoxide hydrolase in human tissues, *J Histochem Cytochem* 54 [3], Seite 329-35. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16314446](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16314446)
- [68] Ai, D.; Fu, Y.; Guo, D.; Tanaka, H.; Wang, N.; Tang, C.; Hammock, B. D.; Shyy, J. Y. und Zhu, Y. (2007): Angiotensin II up-regulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [21], Seite 9018-23. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17495027](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17495027)
- [69] Dorrance, A. M.; Rupp, N.; Pollock, D. M.; Newman, J. W.; Hammock, B. D. und Imig, J. D. (2005): An epoxide hydrolase inhibitor, 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid (AUDA), reduces ischemic cerebral infarct size in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *J Cardiovasc Pharmacol* 46 [6], Seite 842-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16306811](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16306811)
- [70] Imig, J. D. (2006): Cardiovascular therapeutic aspects of soluble epoxide hydrolase inhibitors, *Cardiovasc Drug Rev* 24 [2], Seite 169-88. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16961727](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16961727)
- [71] Jung, O.; Brandes, R. P.; Kim, I. H.; Schweda, F.; Schmidt, R.; Hammock, B. D.; Busse, R. und Fleming, I. (2005): Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension, *Hypertension* 45 [4], Seite 759-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15699457](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15699457)
- [72] Xu, D.; Li, N.; He, Y.; Timofeyev, V.; Lu, L.; Tsai, H. J.; Kim, I. H.; Tuteja, D.; Mateo, R. K.; Singapur, A.; Davis, B. B.; Low, R.; Hammock, B. D. und Chiamvimonvat, N. (2006): Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [49], Seite 18733-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17130447](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17130447)

- [73] Olearczyk, J. J.; Field, M. B.; Kim, I. H.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. und Imig, J. D. (2006): Substituted adamantyl-urea inhibitors of the soluble epoxide hydrolase dilate mesenteric resistance vessels, *J Pharmacol Exp Ther* 318 [3], Seite 1307-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16772540](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16772540)
- [74] Ng, V. Y.; Morisseau, C.; Falck, J. R.; Hammock, B. D. und Kroetz, D. L. (2006): Inhibition of smooth muscle proliferation by urea-based alkanolic acids via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent repression of cyclin D1, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 [11], Seite 2462-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16917105](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16917105)
- [75] Seubert, J. M.; Sinal, C. J.; Graves, J.; DeGraff, L. M.; Bradbury, J. A.; Lee, C. R.; Goralski, K.; Carey, M. A.; Luria, A.; Newman, J. W.; Hammock, B. D.; Falck, J. R.; Roberts, H.; Rockman, H. A.; Murphy, E. und Zeldin, D. C. (2006): Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function, *Circ Res* 99 [4], Seite 442-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16857962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16857962)
- [76] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193 [1], Seite 265-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14907713](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14907713)
- [77] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5432063](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063)
- [78] Falck, J. R.; Yadagiri, P. und Capdevila, J. (1990): Synthesis of epoxyeicosatrienoic acids and heteroatom analogs, *Methods Enzymol* 187, Seite 357-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2233353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2233353)
- [79] Rosolowsky, M. und Campbell, W. B. (1996): Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells, *Biochim Biophys Acta* 1299 [2], Seite 267-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8555273](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8555273)
- [80] **De Boer, T. J. und Backer, H. J.** (1954): A new method for the preparation of diazomethane., *Recueil des Travaux Chimique des Pays-Bas* 73, Seite 229-234.
- [81] Croft, K. D.; McGiff, J. C.; Sanchez-Mendoza, A. und Carroll, M. A. (2000): Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels, *Am J Physiol Renal Physiol* 279 [3], Seite F544-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10966934](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10966934)
- [82] Holtwick, R.; Gotthardt, M.; Skryabin, B.; Steinmetz, M.; Potthast, R.; Zetsche, B.; Hammer, R. E.; Herz, J. und Kuhn, M. (2002): Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [10], Seite 7142-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11997476](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11997476)
- [83] Monti, J.; Fischer, J.; Paskas, S.; Heinig, M.; Schulz, H.; Gosele, C.; Heuser, A.; Fischer, R.; Schmidt, C.; Schirdewan, A.; Gross, V.; Hummel, O.; Maatz, H.; Patone, G.; Saar, K.; Vingron, M.; Weldon, S. M.; Lindpaintner, K.; Hammock, B. D.; Rohde, K.; Dietz, R.; Cook, S. A.; Schunck, W. H.; Luft, F. C. und Hubner, N. (2008): Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease, *Nat Genet* 40 [5], Seite 529-37. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18443590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18443590)
- [84] Schwarz, D.; Kisselev, P.; Ericksen, S. S.; Szklarz, G. D.; Chernogolov, A.; Honeck, H.; Schunck, W. H. und Roots, I. (2004): Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid, *Biochem Pharmacol* 67 [8], Seite 1445-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15041462](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15041462)

- [85] Capdevila, J. H.; Wei, S.; Helvig, C.; Falck, J. R.; Belosludtsev, Y.; Truan, G.; Graham-Lorence, S. E. und Peterson, J. A. (1996): The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3, *J Biol Chem* 271 [37], Seite 22663-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8798438](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8798438)
- [86] Miyazaki, J.; Takaki, S.; Araki, K.; Tashiro, F.; Tominaga, A.; Takatsu, K. und Yamamura, K. (1989): Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5, *Gene* 79 [2], Seite 269-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2551778](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2551778)
- [87] Niwa, H.; Yamamura, K. und Miyazaki, J. (1991): Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, *Gene* 108 [2], Seite 193-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1660837](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1660837)
- [88] Miyata, N.; Taniguchi, K.; Seki, T.; Ishimoto, T.; Sato-Watanabe, M.; Yasuda, Y.; Doi, M.; Kametani, S.; Tomishima, Y.; Ueki, T.; Sato, M. und Kameo, K. (2001): HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme, *Br J Pharmacol* 133 [3], Seite 325-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11375247](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11375247)
- [89] Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Dowdy, D.; Zheng, J.; Greene, J. F.; Sanborn, J. R. und Hammock, B. D. (1999): Potent urea and carbamate inhibitors of soluble epoxide hydrolases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [16], Seite 8849-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10430859](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10430859)
- [90] Morisseau, C. und Hammock, B. D. (2005): Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, Seite 311-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15822179](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15822179)
- [91] Lasker, J. M.; Chen, W. B.; Wolf, I.; Bloswick, B. P.; Wilson, P. D. und Powell, P. K. (2000): Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11, *J Biol Chem* 275 [6], Seite 4118-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10660572](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10660572)
- [92] Kalsotra, A.; Anakk, S.; Boehme, C. L. und Strobel, H. W. (2002): Sexual dimorphism and tissue specificity in the expression of CYP4F forms in Sprague Dawley rats, *Drug Metab Dispos* 30 [9], Seite 1022-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12167568](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12167568)
- [93] Xu, F.; Falck, J. R.; Ortiz de Montellano, P. R. und Kroetz, D. L. (2004): Catalytic activity and isoform-specific inhibition of rat cytochrome p450 4F enzymes, *J Pharmacol Exp Ther* 308 [3], Seite 887-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14634044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14634044)
- [94] Bellamine, A.; Wang, Y.; Waterman, M. R.; Gainer, J. V., 3rd; Dawson, E. P.; Brown, N. J. und Capdevila, J. H. (2003): Characterization of the CYP4A11 gene, a second CYP4A gene in humans, *Arch Biochem Biophys* 409 [1], Seite 221-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12464262](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12464262)
- [95] Carroll, M. A.; Sala, A.; Dunn, C. E.; McGiff, J. C. und Murphy, R. C. (1991): Structural identification of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites formed by rabbit medullary thick ascending limb cells, *J Biol Chem* 266 [19], Seite 12306-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1648091](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1648091)
- [96] Kaduce, T. L.; Fang, X.; Harmon, S. D.; Oltman, C. L.; Dellsperger, K. C.; Teesch, L. M.; Gopal, V. R.; Falck, J. R.; Campbell, W. B.; Weintraub, N. L. und Spector, A. A. (2004): 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) metabolism in coronary endothelial cells, *J Biol Chem* 279 [4], Seite 2648-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14612451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612451)

- [97] Fang, X.; Dillon, J. S.; Hu, S.; Harmon, S. D.; Yao, J.; Anjaiah, S.; Falck, J. R. und Spector, A. A. (2007): 20-carboxy-arachidonic acid is a dual activator of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82 [1-4], Seite 175-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17164145](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17164145)
- [98] Scheller, U.; Zimmer, T.; Becher, D.; Schauer, F. und Schunck, W. H. (1998): Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to alpha,omega-dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3, *J Biol Chem* 273 [49], Seite 32528-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9829987](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9829987)
- [99] Schenkman, J. B. und Jansson, I. (2003): The many roles of cytochrome b5, *Pharmacol Ther* 97 [2], Seite 139-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12559387](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12559387)
- [100] Loughran, P. A.; Roman, L. J.; Miller, R. T. und Masters, B. S. (2001): The kinetic and spectral characterization of the E. coli-expressed mammalian CYP4A7: cytochrome b5 effects vary with substrate, *Arch Biochem Biophys* 385 [2], Seite 311-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11368012](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11368012)
- [101] DeLozier, T. C.; Tsao, C. C.; Coulter, S. J.; Foley, J.; Bradbury, J. A.; Zeldin, D. C. und Goldstein, J. A. (2004): CYP2C44, a new murine CYP2C that metabolizes arachidonic acid to unique stereospecific products, *J Pharmacol Exp Ther* 310 [3], Seite 845-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15084647](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15084647)
- [102] Heng, Y. M.; Kuo, C. S.; Jones, P. S.; Savory, R.; Schulz, R. M.; Tomlinson, S. R.; Gray, T. J. und Bell, D. R. (1997): A novel murine P-450 gene, *Cyp4a14*, is part of a cluster of *Cyp4a* and *Cyp4b*, but not of *CYP4F*, genes in mouse and humans, *Biochem J* 325 ( Pt 3), Seite 741-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9271096](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9271096)
- [103] Brouillette, J.; Rivard, K.; Lizotte, E. und Fiset, C. (2005): Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens, *Cardiovasc Res* 65 [1], Seite 148-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15621042](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15621042)
- [104] Xue, B.; Johnson, A. K. und Hay, M. (2007): Sex differences in angiotensin II- induced hypertension, *Braz J Med Biol Res* 40 [5], Seite 727-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17464437](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17464437)
- [105] Park, K. M.; Kim, J. I.; Ahn, Y.; Bonventre, A. J. und Bonventre, J. V. (2004): Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury, *J Biol Chem* 279 [50], Seite 52282-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15358759](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15358759)
- [106] Hartner, A.; Cordasic, N.; Klanke, B.; Veelken, R. und Hilgers, K. F. (2003): Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice, *Nephrol Dial Transplant* 18 [10], Seite 1999-2004. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13679473](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13679473)
- [107] Ma, L. J. und Fogo, A. B. (2003): Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background, *Kidney Int* 64 [1], Seite 350-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12787428](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12787428)
- [108] Kuhel, D. G.; Zhu, B.; Witte, D. P. und Hui, D. Y. (2002): Distinction in genetic determinants for injury-induced neointimal hyperplasia and diet-induced atherosclerosis in inbred mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 [6], Seite 955-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12067904](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12067904)
- [109] Wang, J. S.; Singh, H.; Zhang, F.; Ishizuka, T.; Deng, H.; Kemp, R.; Wolin, M. S.; Hintze, T. H.; Abraham, N. G.; Nasjletti, A. und Laniado-Schwartzman, M. (2006): Endothelial dysfunction and



- hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus, *Circ Res* 98 [7], Seite 962-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16543501](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16543501)
- [110] Regitz-Zagrosek, V. (2006): Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease, *Nat Rev Drug Discov* 5 [5], Seite 425-38. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16672926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16672926)
- [111] Sato, M.; Ishii, T.; Kobayashi-Matsunaga, Y.; Amada, H.; Taniguchi, K.; Miyata, N. und Kameo, K. (2001): Discovery of a N'-hydroxyphenylformamidine derivative HET0016 as a potent and selective 20-HETE synthase inhibitor, *Bioorg Med Chem Lett* 11 [23], Seite 2993-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11714595](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11714595)
- [112] Kim, I. H.; Morisseau, C.; Watanabe, T. und Hammock, B. D. (2004): Design, synthesis, and biological activity of 1,3-disubstituted ureas as potent inhibitors of the soluble epoxide hydrolase of increased water solubility, *J Med Chem* 47 [8], Seite 2110-22. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15056008](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15056008)
- [113] Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Newman, J. W.; Wheelock, C. E.; Dowdy, D. L. und Hammock, B. D. (2002): Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases, *Biochem Pharmacol* 63 [9], Seite 1599-608. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12007563](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12007563)
- [114] Falck, J. R.; Krishna, U. M.; Reddy, Y. K.; Kumar, P. S.; Reddy, K. M.; Hittner, S. B.; Deeter, C.; Sharma, K. K.; Gauthier, K. M. und Campbell, W. B. (2003): Comparison of vasodilatory properties of 14,15-EET analogs: structural requirements for dilation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 [1], Seite H337-49. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12388250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12388250)
- [115] Gauthier, K. M.; Falck, J. R.; Reddy, L. M. und Campbell, W. B. (2004): 14,15-EET analogs: characterization of structural requirements for agonist and antagonist activity in bovine coronary arteries, *Pharmacol Res* 49 [6], Seite 515-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15026029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15026029)
- [116] Yang, W.; Gauthier, K. M.; Reddy, L. M.; Sangras, B.; Sharma, K. K.; Nithipatikom, K.; Falck, J. R. und Campbell, W. B. (2005): Stable 5,6-epoxyeicosatrienoic acid analog relaxes coronary arteries through potassium channel activation, *Hypertension* 45 [4], Seite 681-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15699458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15699458)
- [117] Barbosa-Sicard, E.; Markovic, M.; Honeck, H.; Christ, B.; Muller, D. N. und Schunck, W. H. (2005): Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily, *Biochem Biophys Res Commun* 329 [4], Seite 1275-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15766564](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15766564)
- [118] Fischer, R.; Dechend, R.; Qadri, F.; Markovic, M.; Feldt, S.; Herse, F.; Park, J. K.; Gapelyuk, A.; Schwarz, I.; Zacharzowsky, U. B.; Plehm, R.; Safak, E.; Heuser, A.; Schirdewan, A.; Luft, F. C.; Schunck, W. H. und Muller, D. N. (2008): Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and direct renin inhibition improve electrical remodeling in a model of high human renin hypertension, *Hypertension* 51 [2], Seite 540-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18158339](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18158339)
- [119] Hoagland, K. M.; Flasch, A. K. und Roman, R. J. (2003): Inhibitors of 20-HETE formation promote salt-sensitive hypertension in rats, *Hypertension* 42 [4], Seite 669-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12874093](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12874093)
- [120] Cheng, J.; Ou, J. S.; Singh, H.; Falck, J. R.; Narsimhaswamy, D.; Pritchard, K. A., Jr. und Schwartzman, M. L. (2008): 20-hydroxyeicosatetraenoic acid causes endothelial dysfunction via eNOS uncoupling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 [2], Seite H1018-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18156192](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18156192)

- [121] Seki, T.; Ishimoto, T.; Sakurai, T.; Yasuda, Y.; Taniguchi, K.; Doi, M.; Sato, M.; Roman, R. J. und Miyata, N. (2005): Increased excretion of urinary 20-HETE in rats with cyclosporine-induced nephrotoxicity, *J Pharmacol Sci* 97 [1], Seite 132-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15655287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15655287)
- [122] Singh, H.; Cheng, J.; Deng, H.; Kemp, R.; Ishizuka, T.; Nasjletti, A. und Schwartzman, M. L. (2007): Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension, *Hypertension* 50 [1], Seite 123-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17548721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17548721)
- [123] Lu, P.; Liu, F.; Wang, C. Y.; Chen, D. D.; Yao, Z.; Tian, Y.; Zhang, J. H. und Wu, Y. H. (2005): Gender differences in hepatic ischemic reperfusion injury in rats are associated with endothelial cell nitric oxide synthase-derived nitric oxide, *World J Gastroenterol* 11 [22], Seite 3441-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15948251](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15948251)
- [124] Fornage, M.; Boerwinkle, E.; Doris, P. A.; Jacobs, D.; Liu, K. und Wong, N. D. (2004): Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study, *Circulation* 109 [3], Seite 335-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14732757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14732757)
- [125] Koerner, I. P.; Jacks, R.; DeBarber, A. E.; Koop, D.; Mao, P.; Grant, D. F. und Alkayed, N. J. (2007): Polymorphisms in the human soluble epoxide hydrolase gene EPHX2 linked to neuronal survival after ischemic injury, *J Neurosci* 27 [17], Seite 4642-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17460077](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17460077)
- [126] Przybyla-Zawislak, B. D.; Srivastava, P. K.; Vazquez-Matias, J.; Mohrenweiser, H. W.; Maxwell, J. E.; Hammock, B. D.; Bradbury, J. A.; Enayetallah, A. E.; Zeldin, D. C. und Grant, D. F. (2003): Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase, *Mol Pharmacol* 64 [2], Seite 482-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12869654](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12869654)
- [127] Sandberg, M.; Hassett, C.; Adman, E. T.; Meijer, J. und Omiecinski, C. J. (2000): Identification and functional characterization of human soluble epoxide hydrolase genetic polymorphisms, *J Biol Chem* 275 [37], Seite 28873-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10862610](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10862610)
- [128] van Loo, B.; Kingma, J.; Arand, M.; Wubbolts, M. G. und Janssen, D. B. (2006): Diversity and biocatalytic potential of epoxide hydrolases identified by genome analysis, *Appl Environ Microbiol* 72 [4], Seite 2905-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16597997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16597997)
- [129] Loch, D.; Hoey, A.; Morisseau, C.; Hammock, B. O. und Brown, L. (2007): Prevention of hypertension in DOCA-salt rats by an inhibitor of soluble epoxide hydrolase, *Cell Biochem Biophys* 47 [1], Seite 87-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17406062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17406062)
- [130] Sellers, K. W.; Sun, C.; Diez-Freire, C.; Waki, H.; Morisseau, C.; Falck, J. R.; Hammock, B. D.; Paton, J. F. und Raizada, M. K. (2005): Novel mechanism of brain soluble epoxide hydrolase-mediated blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rat, *Faseb J* 19 [6], Seite 626-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15659536](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15659536)
- [131] Li, J.; Carroll, M. A.; Chander, P. N.; Falck, J. R.; Sangras, B. und Stier, C. T. (2008): Soluble epoxide hydrolase inhibitor, AUDA, prevents early salt-sensitive hypertension, *Front Biosci* 13, Seite 3480-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18508449](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18508449)
- [132] Sinal, C. J.; Miyata, M.; Tohkin, M.; Nagata, K.; Bend, J. R. und Gonzalez, F. J. (2000): Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation, *J Biol Chem* 275 [51], Seite 40504-10. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11001943](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11001943)
- [133] Pinot, F.; Grant, D. F.; Spearow, J. L.; Parker, A. G. und Hammock, B. D. (1995): Differential regulation of soluble epoxide hydrolase by clofibrate and sexual hormones in the liver and kidneys of mice, *Biochem Pharmacol* 50 [4], Seite 501-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7646556](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7646556)
- [134] Koerner, I. P.; Zhang, W.; Cheng, J.; Parker, S.; Hurn, P. D. und Alkayed, N. J. (2008): Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia, *Front Biosci* 13, Seite 2833-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17981757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17981757)
- [135] Fer, M.; Dreano, Y.; Lucas, D.; Corcos, L.; Salaun, J. P.; Berthou, F. und Amet, Y. (2008): Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450, *Arch Biochem Biophys* 471 [2], Seite 116-25. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18206980](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18206980)
- [136] Schwarz, D.; Kisselev, P.; Chernogolov, A.; Schunck, W. H. und Roots, I. (2005): Human CYP1A1 variants lead to differential eicosapentaenoic acid metabolite patterns, *Biochem Biophys Res Commun* 336 [3], Seite 779-83. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16153604](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16153604)
- [137] Hercule, H. C.; Salanova, B.; Essin, K.; Horst, H.; Falck, J. R.; Sausbier, M.; Rut, P.; Schunck, W. H.; Luft, F. C. und Gollasch, M. (2007): The vasodilator 17,18-Epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK {alpha} channel subunit, *Exp Physiol*. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17675416](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17675416)
- [138] Lauterbach, B.; Barbosa-Sicard, E.; Wang, M. H.; Honeck, H.; Kargel, E.; Theuer, J.; Schwartzman, M. L.; Haller, H.; Luft, F. C.; Gollasch, M. und Schunck, W. H. (2002): Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators, *Hypertension* 39 [2 Pt 2], Seite 609-13. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11882617](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11882617)

## Abkürzungsverzeichnis

20-COOH-AA	Eicosatetraendisäure
AA	Arachidonsäure
Ang II	Angiotensin II
BK-Kanal	Calcium-abhängiger Kalium Kanal
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
CP	Chiral Phase
CPR	NADPH-CYP Reduktase
CYP	Cytochrom P450
DDDA	Dodecandisäure
DHA	Docsahexaensäure
DHET	Dihydroxyeicosatriensäure
DHETeTr	Dihydroxy-Eicosatretraensäure
EC	Endothelzelle
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
EDP	Epoxydocosapentaensäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EETeTr	Epoxyeicosatretraensäure
EnaC	epithelialer Natrium Kanal
EPA	Eicosapentaensäure
ER	endoplasmatischer Retikulum
FABP	Fettsäure-bindendes Protein
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid

FPP	Farnesyl-Pyrophosphat
GCPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GGPP	Geranylgeranyl-Pyrophosphat
HDHET	Dihydroxy-Hydroxyeicosatriensäure
HEET	Hydroxy-Epoxyeicosatriensäure
HEPE	Hydroxyeicosapentaensäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HO	Hämoxygenase
HPLC	hoch-auflösende Flüssigkeits-Chromatographie
I/R	Ischämie / Reperfusion
LA	Laurinsäure
LOX	Lipoxygenase
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Normal Phase
OH-LA	Hydroxylaurinsäure
PLA2	Phospholipase A2
PPAR	Peroxisom Proliferations-aktivierter Rezeptor
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure
ROS, O2-	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reverse Phase
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
TAC	thoracic aortic constriction
TALH	dicker aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die drei Wege der Arachidonsäure-Kaskade. ....	2
Abbildung 1-2: Struktur und Funktion von Cytochrom P450-Enzymen im endoplasmatischen Retikulum. ....	4
Abbildung 1-3: Reaktionstypen und prinzipielle Produkte des Cytochrom P450-abhängigen Arachidonsäure Metabolismus.....	5
Abbildung 1-4: Bildung und Funktion Cytochrom P450 abhängiger Eicosanoide im kardiovaskulären System. ....	12
Abbildung 1-5: Rolle der Cytochrom P450-abhängig gebildeten Eicosanoide bei der Regulation des Gefäßtonus. ....	14
Abbildung 1-6: Rolle der Cytochrom P450-abhängig gebildeten AA Metabolite im tubulären System der Niere. ....	16
Abbildung 1-7: „Metabolisches Schicksal“ von Eicosanoiden am Beispiel der EETs.....	18
Abbildung 1-8: Struktur und Funktion der löslichen Epoxidhydrolase (sEH). ....	20
Abbildung 2-1: Klonierungsvektoren pCR2.1, pFastBac1, pcDNA3 und pBS-CX1-loxP-eGFP-loxP.....	25
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Gewinnung von funktionellen CYP/CPR Systemen. ....	50
Abbildung 3-2: Charakteristisches CO-Differenzspektrum (A) einer Einzelexpression von Cyp4a12a und (B) einer Koexpression von Cyp4a12a und der hCPR. ....	53
Abbildung 3-3: Nachweis der heterolog in Sf9-Insektenzellen exprimierten Cyp4a-Isoformen im Westernblot und Spezifitätsnachweis der unterschiedlichen Antikörper.....	55
Abbildung 3-4: Laurinsäure und ihre Hydroxylierungsprodukte. ....	56
Abbildung 3-5: Laurinsäuremetabolismus rekombinanter Cyp4a-Enzyme aus der Maus. ....	57
Abbildung 3-6: Schrittweise Hydroxylierung von 12-OH-Laurinsäure zu Dodekandisäure und von 11-OH-LA zu 11-Keto-Laurinsäure. ....	58
Abbildung 3-7: Arachidonsäure und ihre Hydroxylierungsprodukte. ....	59
Abbildung 3-8: Arachidonsäuremetabolismus rekombinanter Cyp4a-Enzyme aus der Maus. ....	60
Abbildung 3-9: Analyse der Regioselektivität von Cyp4a12a und Cyp4a12b bei der Hydroxylierung von Arachidonsäure. ....	61
Abbildung 3-10: Schrittweise Hydroxylierung von 20-HETE zu Eicosatetraendisäure. ....	62
Abbildung 3-11: 20-HETE Oxidation durch Cyp4a12a.....	62
Abbildung 3-12: Eicosapentaensäure und ihre Hydroxylierungs- und Epoxidationsprodukte. ....	64

Abbildung 3-13: Eicosapentaensäuremetabolismus rekombinanter Cyp4a-Enzyme aus der Maus.....	65
Abbildung 3-14: Identifizierung von 17,18-EETeTr anhand seines Massenspektrums. ....	66
Abbildung 3-15: Stereoselektivität der Epoxidation von Eicosapentaensäure durch Cyp4a12a und Cyp4a12b...	66
Abbildung 3-16: Regioselektivität der Hydroxylierung von Eicosapentaensäure durch Cyp4a12a und Cyp4a12b. .....	67
Abbildung 3-17: Geschlechts- und stammspezifische mRNA Expression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere. .....	71
Abbildung 3-18: Geschlechts- und stammspezifische Proteinexpression der Cyp4a-Isoformen in der Mausniere. .....	72
Abbildung 3-19: Arachidonsäuremetabolismus männlicher und weiblicher NMRI Mäuse.....	73
Abbildung 3-20: Geschlechts- und stammspezifische Unterschiede in Arachidonsäure Hydroxylase- (A) und Epoxygenaseaktivität (B) von Mausnierenmikrosomen. ....	74
Abbildung 3-21: Einfluss von 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron auf die Cyp4a12a Expression und die mikrosomale 20- HETE Bildung in der Niere männlicher NMRI und C57B/6 Mäuse. ....	77
Abbildung 3-22: Einfluss von 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron auf die mikrosomale 20-HETE Bildung in der Niere weiblicher Lewisratten.....	78
Abbildung 3-23: Schematische Darstellung der Cre/loxP Kreuzung mit ursprünglichen und resultierenden Konstrukten. ....	80
Abbildung 3-24: Taqman-RT-PCR Analyse der Cyp4a12a Expression in Herz (A) und Aorta (B) männlicher und weiblicher C57BL/6 Mäuse mit (+/+) und ohne Überexpression (WT) von Cyp4a12a. ....	82
Abbildung 3-25: Westernblot Analyse der Überexpression von Cyp4a12a in männlichen (A) und weiblichen (B) Tieren.....	83
Abbildung 3-26: Immunhistochemie an Kryo-Schnitten von Herzen aus Cyp412a Cre/loxP (+/+) und WT Mäusen.....	84
Abbildung 3-27: Schematische Darstellung des Querschnittes eines Blutgefäßes.....	85
Abbildung 3-28: HET0016-Hemmung der Cyp4a katalysierten Hydroxylierung von Laurinsäure (A) und Arachidonsäure (B).....	87
Abbildung 3-29: Arachidonsäure und mögliche CYP- und sEH-abhängige Primär und Sekundärmetabolite.....	89
Abbildung 3-30: Wirkung von HET0016 auf den mikrosomalen AA Metabolismus der Leber von FVB/N Männchen. ....	90
Abbildung 3-31: Wirkung von HET0016 auf den renalen mikrosomalen AA Metabolismus von FVB/N Männchen. ....	91

Abbildung 3-32: Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 in Nierenmikrosomen von SD Ratten. ....	92
Abbildung 3-33: Dosis-Wirkungskurve für die Hemmung der 20-HETE Produktion in Nierenmikrosomen männlicher und weiblicher Lewisratten durch HET0016. ....	93
Abbildung 3-34: Hemmung der 20-HETE Bildung durch HET0016 in humanen Lebermikrosomen.....	94
Abbildung 3-35: Veränderungen des renalen mikrosomalen AA Metabolismus bei Uninephrektomie, I/R und HET0016 Behandlung in Lewisratten. ....	97
Abbildung 3-36: Geschlechts- und Stammunterschiede der sEH Aktivität in der Mausniere.....	99
Abbildung 3-37: Dosisabhängige Hemmung der Hydrolaseaktivität in der zytosolischen Fraktion von Nieren (A) und in isolierten Gefäßen (B) männlicher FVB/N Mäuse. ....	100
Abbildung 3-38: Elektronenmikroskopischer Nachweis der sEH in Ultradünnschnitten des Herzens von FVB/N Wildtyp (A) und sEH knockout (B) Mäusen. ....	102
Abbildung 3-39: Stammspezifische Unterschiede in der sEH Aktivität der Niere (A) und stamm- und allelspezifische Unterschiede in der sEH Aktivität im Herzen (B).....	104
Abbildung 3-40: Trennung der Synthese racemischer EETs mittels RP-HPLC (A) und NP-HPLC (B). ....	106
Abbildung 3-41: Trennung synthetischer stereoisomerer Epoxide aus EPA und DHA mittels RP-HPLC (A und C) und CP-HPLC (B und D).....	107
Abbildung 3-42: Repräsentative RP-HPLC Chromatogramme der sEH katalysierten Hydrolyse von 11,12-EET (A), 14,15-EET (B), 17,18-EETeTr (C) und 19,20-EDP (D). ....	109
Abbildung 3-43: Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten der sEH von Maus, Ratte und Mensch mit den racemischen Substraten 14,15-EET, 11,12-EET 17,18-EETeTr und 19,20-EDP. ....	110
Abbildung 3-44: Enantiomere von 11,12-EET, 14,15-EET, 17,18-EETeTr und 19,20-EDP.....	110
Abbildung 3-45: Stereoselektive Hydrolyse von 14,15-EET durch die sEH der Maus. ....	111
Abbildung 3-46: Michaelis-Menten Kinetik der gereinigten rekombinanten sEH der Maus für 17(R),18(S)-EETeTr, 17(S),18(R)-EETeTr, 19(R),20(S)-EDP und 19(S),20(R)-EDP. ....	112
Abbildung 4-1: CYP4ABX cluster von Mensch, Maus und Ratte [9]; <a href="http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html">http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html</a> ).....	117
Abbildung 4-2: Vergleich des AA und EPA Metabolitenprofils von Cyp4a12a und Nierenmikrosomen männlicher NMRI Mäuse. ....	122
Abbildung 4-3: Möglichkeiten der gezielten Beeinflussung der CYP-Eicosanoid-Balance. ....	127
Abbildung 4-4: Wirkung von HET0016 auf (A) die Nierenschädigung durch I/R und (B) die Apoptoserate [noch nicht veröffentlichte Daten, Hoff et al.].....	129
Abbildung 4-5: Pro- und anti-hypertensive Wirkung von 20-HETE in der Niere.....	130



Abbildung 4-6: Polymorphismen in der Promoter- und kodierender Region von Ephx2 [83].....	132
Abbildung 4-7: Strukturformeln der sEH Inhibitoren ADU, AUDA und CDU. ....	133
Abbildung 4-8: Positive Wirkungen von EETs in der Vaskulatur. ....	134
Abbildung 4-9: Wirkung von 20-HETE und 17,18-EETeTr auf glatte Muskelzellen (VSMC). ....	136
Abbildung 4-10: Negativ chronotroper Effekt von 17(R),18(S)-EETeTr auf die Schlagrate spontan schlagender neonataler Rattenkardiomyozyten. ....	137
Abbildung 5-1: Mausmodelle zur Überexpression von Cyp4a12a in VSMC, Nierentubuli und Kardiomyozyten. ....	138

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Funktionelle CYP-Gene im Genom von Maus, Ratte und Mensch und mögliche AA Hydroxylasen und Epoxygenasen.....	7
Tabelle 1-2: CYP4A $\omega$ -Hydroxylasen [19]. .....	8
Tabelle 2-1: TaqMan-RT-PCR Primer für Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b und Cyp4a14. ....	23
Tabelle 2-2: Primer für die Klonierung der Cyp4a-Isoformen der Maus. ....	24
Tabelle 2-3: Adapter zur Umklonierung von Cyp4a12a.....	26
Tabelle 2-4: Primer zur Genotypisierung. ....	27
Tabelle 2-5: Verwendete Mikroorganismen. ....	27
Tabelle 2-6: Eingesetzte sEH Proteinkonzentrationen. ....	42
Tabelle 2-7: Retentionszeiten von LA, AA, EPA, DHA und ihren Produkten in der RP-HPLC.....	43
Tabelle 3-1: Sequenzidentitäten der vier Cyp4a-Isoformen der Maus. ....	52
Tabelle 3-2: Metabolismus von Laurinsäure durch rekombinante Cyp4a-Enzyme. ....	58
Tabelle 3-3: Metabolismus von Arachidonsäure durch rekombinante Cyp4a-Enzyme.....	63
Tabelle 3-4: Metabolismus von Eicosapentaensäure durch rekombinante Cyp4a-Enzyme. ....	68
Tabelle 3-5: Relative Umsätze der Enantiomere der unterschiedlichen Substrate. ....	112
Tabelle 3-6: Enzymkinetik der gereinigten rekombinanten sEH aus Maus, Ratte und Mensch für die Enantiomere von 17,18-EETeTr und 19,20-EDP.....	113
Tabelle 4-1: Homologien in der Aminosäuresequenzen von CYP4A-Isoformen.....	118
Tabelle 4-2: Vergleich der 20-HETE Bildung mit der Expression von Cyp4a10, Cyp4a12a und Cyp4a14. ....	123

## Publikationen

Journal	Autoren	Titel
Cardiovascular Hormon Systems, Wiley-VHC, <i>in press</i>	Wolf-Hagen Schunck und <b>Cosima Schmidt</b>	Cytochrome P450-Dependent Eicosanoids
Nat Genet. 2008 May;40(5):529- 37.	Jan Monti, Judith Fischer, Svetlana Paskas, Matthias Heinig, Herbert Schulz, Claudia Gösele, Arnd Heuser, Robert Fischer, <b>Cosima Schmidt</b> , Alexander Schirdewan, Volkmar Gross, Oliver Hummel, Henrike Maatz, Giannino Patone, Kathrin Saar, Martin Vingron, Steven M Weldon, Klaus Lindpaintner, Bruce D Hammock, Klaus Rohde, Rainer Dietz, Stuart A Cook, Wolf-Hagen Schunck, Friedrich C Luft, Norbert Hubner	"Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease"
Arch Biochem Biophys. 2008 Apr 1;472(1):65-75.	Jana Kulas; <b>Cosima Schmidt</b> ; Michael Rothe; Wolf-Hagen Schunck; Ralph Menzel	"Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> "
Biochem J. 2007 Apr 1;403(1):109- 18.	<b>Cosima Schmidt*</b> ; Dominik N. Muller*; Eduardo Barbosa-Sicard; Maren Wellner; Volkmar Gross; Hantz Hercule; Marija Markovic; Horst Honeck; Fridrich C. Luft; Wolf-Hagen Schunck	"Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation"

## Vorträge

Konferenz	Vortragstitel
The 10th Annual Winter Eicosanoid Conference Baltimore, Maryland, 2008	"PPAR-alpha Activation Induces Renal EET Production and Protects Against End-Organ Damage in a Rat Model of Angiotensin II-induced Hypertension"

## Posterbeiträge

Konferenz	Autoren	Postertitel
Experimental Biology 2008 San Diego, Californien, USA, 2008	<b>Cosima Schmidt</b> ; Robert Fischer; Marija Markovic; Gerd Wallukat; Christophe Morisseau; Bruce Hammock; Wolf-Hagen Schunck	“Stereoselective hydrolysis of epoxy-eicosanoids by mammalian soluble epoxide hydrolases“
European C. elegans Meeting 2008 Carmona (Seville), Spanien, 2008	Jana Kulas; <b>Cosima Schmidt</b> ; Michael Rothe; Wolf-Hagen Schunck; Nadine Saul; Ralph Menzel	“Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosa-pentaenoic acid in the nematode Caenorhabditis elegans “
The 9th Annual Winter Eicosanoid Conference Baltimore, Maryland, USA, 2007	Marija Markovic, Gerd Wallukat, <b>Cosima Schmidt</b> , Dominik N. Muller, Wolf-Hagen Schunck.	“Cytochrome P450-mediated Anti- arrhythmic Effects of Omega- 3Fatty Acids in Cardiac Myocytes”
60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease San Antonio; USA, 2006	Marija Markovic, Gerd Wallukat, <b>Cosima Schmidt</b> , Friedrich C. Luft, Dominik N. Muller, Wolf-Hagen Schunck	„Role of cytochrome P450 enzymes in mediating cardioprotective effects of omega- 3 fatty acids“
16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations Budapest; HU, 2006	<b>Cosima Schmidt</b> , Eduardo Barbosa Sicard, Maren Wellner, Matthias Gerhard, Marija Markovic, Volkmar Gross, Friedrich C. Luft, Dominik N. Muller, Wolf-Hagen Schunck	“Mouse Cyp4a Isoforms: Enzymatic Properties, Strain- and Gender-Specific Expression and Role in Renal 20-HETE Synthesis”
16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations Budapest; HU, 2006	Marija Markovic, Cosima Schmidt, Dominik N. Muller, Friedrich C. Luft, Wolf-Hagen Schunck	„Metabolism of Fish Oil Omega-3 Fatty Acids b y Cytochrome P450 Enzymes “
The 8th Annual Winter Eicosanoid Conference Baltimore, Maryland, USA, 2006	Marija Markovic, <b>Cosima Schmidt</b> , Dominik N. Muller, Fridrich C. Luft, Wolf-Hagen Schunck	„Comparison of Omega-6 and Omega -3 Fatty Acids as Substrates for Cytochrome P450 Enzymes”
59th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease Washington, DC; USA, 2005	Marija Markovic, <b>Cosima Schmidt</b> , Dominik N. Muller, Friedrich C. Luft, Wolf-Hagen Schunck	“Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-3 polyunsaturated fatty acids”
58th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease Chicago; USA, 2004	Dominik N. Muller, Eduardo Barbosa-Sicard, Maren Wellner, <b>Cosima Schmidt</b> , Horst Honeck, Hantz Hercule, Marija Markovic, Volkmar Gross, Friedrich C. Luft and Wolf-Hagen Schunck	“Gender- and strain-specific expression of Cyp4a isoforms and their role in mouse renal 20-HETE production”

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. A. Herrmann für die Annahme meiner Doktorarbeit im Fach Biologie der Fakultät III der Humboldt Universität Berlin sowie für seine freundliche und kompetente Betreuung.

Dr. W.-H. Schunck danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Sein enormes Fachwissen, seine didaktischen Fähigkeiten, seine ihn auszeichnende Hilfsbereitschaft und Geduld haben mich in den fünf Jahren unserer fruchtbaren Zusammenarbeit sehr beeindruckt und geprägt. Über die Entstehung dieser Arbeit hinaus fühlte ich mich von ihm stets im positiven Sinne gefordert und gefördert. Ich möchte ihm ausdrücklich für den großen Anteil, den er an meinem fachlichen und persönlichen Fortkommen hat, danken.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Schunck erwähnen, ohne deren Hilfe die vorliegende Arbeit so nicht zustande gekommen wäre.

Christel: Danke für die kompetente und zuverlässige Zusammenarbeit bei Tierversuchen und HPLC-Angelegenheiten. Deine vorbildliche Arbeitsbereitschaft war ein Ansporn für mich.

Ramona: Du hast mir gezeigt, wie man vernünftige Westernblots macht und mich durch Deine geduldige Zuarbeit sehr unterstützt.

Micha: Danke, dass Du so manchen Arbeitsfrust durch Deine heitere, humorvolle Art im Keim erstickt hast.

Marija: Es war inhaltlich und persönlich eine Bereicherung, mit Dir internationale Konferenzen zu besuchen.

Allen nicht namentlich genannten derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schunck gilt an dieser Stelle ein von Herzen kommendes Dankeschön.

Nicht zuletzt möchte ich auch PD. Dr. D.N. Müller herausstellen, mit dem in guter Zusammenarbeit wichtige Ergebnisse erzielt wurden. Außerdem bin ich ihm für sein Interesse an meiner Arbeit und deren Entwicklung sehr dankbar.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Dies gilt auch für Tabellen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat und dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Fakultät 1 der Humboldt-Universität zu Berlin ist mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Prof. Dr. Andreas Herrmann (Humboldt Universität zu Berlin) und Dr. Wolf-Hagen Schunck (MDC-Berlin) betreut.

Die Promotion wurde mit Fördermitteln der DFG, des MDC-Berlin und der Charité durchgeführt.

Berlin, 05.08.2008

---

Cosima Schmidt